MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN PEPTIDEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard – Karls – Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
WILFRIED KÖNIG
aus Römerstadt
1968

9614

M A S S E N S P E K T R O M E T R I S C H E

U N T E R S U C H U N G E N A N P E P T I D E N

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Wilfried K ö n i g

aus Römerstadt

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Mai 1968

Dekan: Prof. Dr. H. Blume

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

2. Berichterstatter: Dozent Dr. H. Suhr

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1966 bis Februar 1968 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer,

danke ich herzlich für sein stetes Interesse und für die sehr großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Hanspaul Hagenmaier möchte ich an dieser Stelle für viele wertvolle Ratschläge herzlich danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0038

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A Einleitung	1
B Allgemeiner Teil	3
I. Derivatbildung der Peptide	3
1. Veresterung	4
a) Chlorwasserstoff/Methanol	4
b) Veresterung mit Thionylchlorid	5
c) Veresterung mit Diazomethan	5
2. Trifluoracetylierung	6
a) Trifluoressigsäureanhydrid	6
b) Trifluoressigsäuremethylester	7
3. Andere Schutzgruppen	7
II. Massenspektrometrie und Gas-Chromatographie von TFA-Peptidestern	13
1. Ableitung der Aminosäuresequenz	13
2. Massenspektrometrische Untersuchungen an Cysteinpeptiden	15
a) N-terminales S-Benzyl-Cystein	22
b) S-Benzyl-Cystein in der Sequenz	22
c) C-terminales S-Benzyl-Cystein	24
3. Massenspektrometrische Untersuchungen an Asparagin- und Glutaminpeptiden	26
4. Massenspektrometrische Untersuchungen an Serinpeptiden	28
5. Gaschromatographische Untersuchungen	31
III. Anwendungen	36
1. Gramicidin A	36
2. S-Benzyl-Ser^4-Oxytocin	40
a) Gaschromatographische Untersuchungen	44
b) Verteilungs-Chromatographie an Sephadex G 15	46
C Experimenteller Teil	52
I. Gas-Chromatographie - Massenspektrometrie	52
II. Sephadex-Verteilungs-Chromatographie	52

Seite

1. Vorbehandlung des Trägermaterials . . . 52
2. Säule 53
3. Chromatographie 53
4. UV-Spektroskopie 53
II. Herstellung der Peptid-Derivate 54
1. Benzylierung 54
2. Veresterung 54
a) HCl/Methanol 54
b) Thionylchlorid 55
c) Diazomethan 55
α) Herstellung 55
ß) Veresterung 55
3. Trifluoracetylierung 56
4. O-Acetylierung von Serin-Peptiden . . . 56
5. Abspaltung von Peptid-Ketten vom Harz . 56
a) HBr-Trifluoressigsäure 56
b) Methanol/NH_3 57
6. Partial-Hydrolyse von Peptiden 57
a) Saure Hydrolyse 57
b) Alkalische Hydrolyse von Gramicidin A 57
Zusammenfassung 58
Literaturverzeichnis 59

A Einleitung

Die Möglichkeit einer massenspektrometrischen Sequenzanalyse kleinerer Peptide in Form von N-Trifluoracetylpeptidestern wurde erstmals von E. Stenhagen[1] angegeben. Er untersuchte die Massenspektren dieser Verbindungen und fand einige wichtige Fragmentierungsregeln, welche das Erkennen der Aminosäuresequenz in einem Peptid ermöglichen. Schon vorher waren TFA-Peptidester von F. Weygand und Mitarbeitern[2,3] gaschromatographisch getrennt worden. F. Weygand[4] hat zu diesem Zweck auch ein größeres Peptid, die Insulin-A-Kette, partiell hydrolisiert und einige Peptidbruchstücke gaschromatographisch identifiziert. Massenspektrometrische Untersuchungen von TFA-Peptidestern wurden in größerem Umfang ebenfalls von F. Weygand und Mitarbeitern[5] durchgeführt. Dabei wurde eine große Anzahl von Peptid-Derivaten verschiedener Aminosäurezusammensetzung und Kettenlänge untersucht und die wichtigsten Fragmentionen der einzelnen Aminosäuren in Abhängigkeit von ihrer Stellung in der Sequenz in Tabellen zusammengefaßt. Sequenzen, die Arginin, Cystein, Cystin, Glutamin oder Asparagin enthielten, wurden allerdings bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Die Leistungsfähigkeit der Gas-Chromatographie und der Massenspektrometrie bei der Sequenzanalyse wurde kürzlich bei der Aufstellung der Sequenz eines Cyclo-Nonapeptides aus Leinsamen durch A. Prox und F. Weygand[6] bewiesen.

Für die massenspektrometrische Sequenzanalyse größerer Peptide müssen mehrere Bedingungen erfüllt werden:

1. Die Partialhydrolyse muß so durchgeführt werden, daß eine hinreichende Anzahl sich überlappender Teilsequenzen entsteht.

2. Die erhaltenen Bruchstücke müssen sich entweder in ihrer ursprünglichen Form oder in Form von Derivaten voneinander abtrennen lassen.

3. Die Peptide müssen in möglichst stabile und für die Massenspektrometrie genügend flüchtige Derivate überführt werden.

Da bisher keine massenspektrometrischen Untersuchungen von Cysteinpeptiden vorlagen, Cystein jedoch in vielen natürlichen Peptiden vorkommt, sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, die Methode der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Sequenzanalyse auch auf Cysteinpeptide auszudehnen. Weiterhin war die Anwendbarkeit der Methode auf Serin-, Asparagin- und Glutaminpeptide zu überprüfen.

Die Gas-Chromatographie ist als Trennmethode für TFA-Peptidester mit mehreren trifunktionellen Aminosäuren nur begrenzt anwendbar. Daher mußten andere chromatographische Trennmethoden auf ihre Anwendbarkeit zur Trennung dieser Peptide untersucht werden.

B Allgemeiner Teil

Wie die Arbeiten von F. Sanger und H. Tuppy[7] bzw. von F. Sanger und E. O. P. Thompson[8] und in neuerer Zeit die Arbeiten von W. A. Schroeder und Mitarbeitern[9] oder M. Tanaka und Mitarbeitern[10] zeigten, gibt es bereits hervorragende Methoden zur Sequenzanalyse von Peptiden.

Die Einführung der Gas-Chromatographie und der Massenspektrometrie und ihre Weiterentwicklung führte zu Analysenmethoden, die nach dem heutigen Stand zu den wertvollsten und aussagereichsten in der organischen Chemie gehören. Die Frage, ob diese Methoden auch in der Peptid-Chemie, vor allem in der Sequenzanalyse, von Nutzen sein können, lag daher auf der Hand.

I. Derivatbildung der Peptide

Da sowohl für die Anwendung der Gas-Chromatographie als auch der Massenspektrometrie nur unzersetzt verdampfbare Substanzen in Frage kommen, mußten die Peptide in flüchtige Derivate überführt werden. Dies gelang durch Veresterung der freien Carboxylgruppen und durch Trifluoracetylierung der Aminogruppen[2].

Ein Hauptvorteil der Gas-Chromatographie und der Massenspektrometrie ist es, mit sehr geringen Substanzmengen auszukommen. Um diesen Vorteil gegenüber manchen anderen analytischen Methoden ausnützen zu können, mußten die Umsetzungen der Peptide in möglichst hoher Ausbeute erreicht werden. Da verschiedene, vor allem trifunktionelle, Aminosäuren sehr empfindlich gegen Zersetzung

sind, war besonders darauf zu achten, daß das Verfahren zur Herstellung der TFA-Peptidester auf möglichst alle Aminosäuren anwendbar ist, d.h., sehr schonend und ohne ungewünschte Nebenreaktionen abläuft.

In der Literatur sind verschiedene Verfahren angegeben, um zu diesen Derivaten zu gelangen. Einige dieser Methoden wurden in Bezug auf Ausbeute und Nebenreaktionen untersucht.

1. Veresterung

a) Chlorwasserstoff/Methanol

Hierbei wurde nach einem etwas abgewandelten Verfahren der Aminosäure-Veresterung nach E. Fischer[11] gearbeitet. Die Peptide wurden dabei mit HCl-gesättigtem Methanol verestert. Obwohl die Reaktionstemperatur 20° C nicht überstieg, zeigte es sich, daß das Verfahren bei verschiedenen Aminosäuren zu Nebenreaktionen führt. Bei der Veresterung von Asparagin-Peptiden wurden regelmäßig die entsprechenden Derivate der Asparaginsäure gefunden. Bei Tryptophan und Tryptophan-Peptiden trat fast vollständige Zersetzung dieser Verbindungen unter Blau- oder Violettfärbung auf. Bei der Veresterung des Peptides Gly-Ser wurden bei mehreren Versuchen jedesmal die Methylester von Gly und Ser, dagegen nie der Ester des Peptides gefunden. Aus diesen Beobachtungen konnte geschlossen werden, daß in stark saurem Medium auch bei tiefen Temperaturen neben der Zersetzung einzelner Aminosäuren auch die Gefahr der Peptidspaltung besteht. Bei vielen Peptiden erwies sich das Verfahren jedoch als zuverlässige und zu guten Ausbeuten führende Methode.

b) Veresterung mit Thionylchlorid nach R. A. Boissonas[12]

Diese Veresterungsmethode ist wesentlich schonender als die nach E. Fischer. Bei der Veresterung von Gly-Ser trat keine Peptidspaltung auf. Auch bei der Veresterung von Asparagin-Peptiden trat nur in geringem Ausmaß Verseifung der Säureamidgruppe zu Asparaginsäure auf. Nachteile der Methode sind, daß nur frisches Thionylchlorid verwendet werden darf, und daß die Veresterung zu viel Zeit in Anspruch nimmt.

c) Veresterung mit Diazomethan

Weitaus der größte Teil aller untersuchten Peptide (s. Tab. 1) wurde mit Diazomethan verestert. Mit Diazomethan können alle Peptide unabhängig von ihrer Kettenlänge und Aminosäurezusammensetzung verestert werden. Da fast alle Peptide in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich sind, wurde die Veresterung in Methanol unter Zugabe weniger Tropfen Wasser durchgeführt. Das Wasser, das ja auch mit Diazomethan reagiert, stört nicht, da die Reaktion mit den Carboxylgruppen der Peptide schneller erfolgt. Bei Tyrosin enthaltenden Peptiden entsteht bei längerer Einwirkung von Diazomethan auch das O-Methyl-Tyrosin-Derivat. Diese Nebenreaktion läßt sich durch Verringern der Reaktionszeit und bei nur geringem Diazomethanüberschuß fast völlig vermeiden. Das O-Methyl-Tyrosin-Derivat ist im Massenspektrum außerdem durch Verschiebung der charakteristischen Massenpeaks um 14 Masseneinheiten leicht zu erkennen.

Eine weniger erfreuliche Nebenreaktion ist die Bildung von Diketopiperazinen, die bevorzugt bei Dipeptiden mit aromatischen Aminosäuren auftritt. Die Veresterung des Dipeptids Phe-Phe führte in mehreren Versuchen immer nur zum cyclischen Diketopiperazin, auch wenn die Reaktion unter 0° C durchgeführt und sofort nach Beendigung der Reaktion mit Eisessig angesäuert wurde. Die Veresterung mit Diazomethan ist jedoch trotz dieses Nachteils allen anderen Methoden vorzuziehen. Ein besonderer Vorteil ist die Schnelligkeit der Reaktion, die bei mg-Mengen an Peptiden in wenigen Sekunden beendet ist. Außerdem ist diese Methode die schonendste und sauberste. Vor allem können damit Asparagin-, Glutamin- und Tryptophan-Peptide ohne Zersetzung verestert werden und eine Peptidspaltung ist ausgeschlossen. Das Diazomethan wurde auf die übliche Art aus Nitrosomethylharnstoff hergestellt, destilliert und als ätherische Lösung bei -40° C aufbewahrt.

2. Trifluoracetylierung

Auch für die Trifluoracetylierung der freien Aminogruppen von Peptidestern sind mehrere Methoden beschrieben worden[13,14,36].

a) Trifluoressigsäureanhydrid

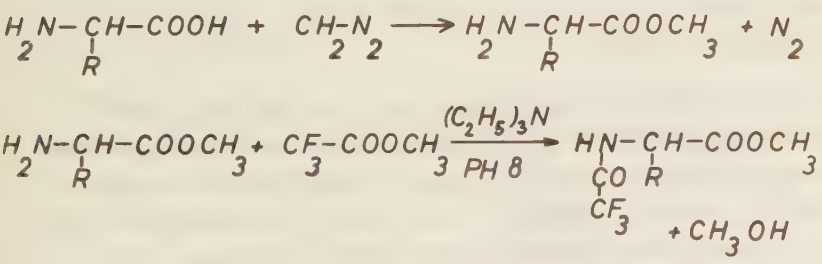
Die Trifluoracetylierung mit Trifluoracetanhydrid hat zwar den Vorteil, daß die Reaktion sehr schnell geht, nachteilig ist jedoch, daß das Reagens relativ agressiv ist, was einerseits bei empfindlichen Aminosäuren (z.B. Tryptophan) zu Zersetzung, andererseits bei Serin, Threonin und Tyrosin zu O-TFA-Derivaten führen kann. Diese Verbindungen zersetzen sich an der Luft und man erhält uneinheitliche Gemische. Außerdem läßt sich das sehr feuchtigkeitsempfindliche

Trifluoressigsäureanhydrid auch in kleinen Mengen nur sehr schwer wasserfrei aufbewahren.

b) Trifluoressigsäuremethylester

Als besser geeignet zur Herstellung von stabilen TFA-Derivaten erwies sich die Aminolyse von Trifluoressigsäuremethylester, der sich ohne Schwierigkeit aus Trifluoressigsäure gewinnen läßt und monatelang unzersetzt haltbar ist. Auch die Ausbeute an TFA-Derivat ist bei dieser Methode gut, da selbst Ausgangsmengen von 1 - 2 mg Peptid noch zu Ausbeuten an TFA-Peptidestern führten, von denen mehrere Massenspektren oder Gas-Chromatogramme gemacht werden konnten.

Die Herstellung von TFA-Derivaten läßt sich in folgendem Schema zusammenfassen:



3. Andere Schutzgruppen

Bei der Trifluoracetylierung von Cysteinmethylester und von Cysteinpeptidestern mit freier SH-Gruppe konnte schon am Geruch die Eliminierung von

H_2S wahrgenommen werden. Die gaschromatographische Untersuchung zeigte dann, daß aus Cysteinmethylester als Hauptprodukt TFA-α-Aminoacrylsäuremethylester entstanden war. Neben der H_2S-Abspaltung besteht bei Cysteinpeptiden immer die Möglichkeit der Oxydation zu Cystin-Derivaten. Diese Gefahr der Zersetzung war in besonderem Maße bei der Partialhydrolyse von größeren Peptiden oder Proteinen, die Cystein enthalten, zu befürchten. Weygand[15] hat daher die Entschwefelung der Cysteinreste mit Raney-Nickel vorgeschlagen, wobei die entsprechenden Alaninderivate entstehen. Die direkte massenspektrometrische Unterscheidung von ursprünglich vorhandenem Alanin ist dann aber schwierig. Um ungewünschte und unkontrollierbare Nebenreaktionen bei der Bearbeitung von Cysteinpeptiden zu vermeiden, wurden Untersuchungen an S-Benzyl-Derivaten angestellt. Die S-Benzyl-Cystein-Peptide ließen sich ohne feststellbare Zersetzung verestern und trifluoracetylieren.

Die Benzylierung kann nach Wood und du Vigneaud[16] mit Benzylchlorid in flüssigem Ammoniak durchgeführt werden. Eine S-Benzylierung in alkalisch-wässriger Lösung nach F. Suter[17] empfiehlt sich dagegen wegen der wesentlich schlechteren Ausbeute nicht.

Serin enthaltende Peptide wurden teilweise zur Vermeidung der Wasserabspaltung O-acetyliert. Dies läßt sich einfach durch Behandeln der Peptide mit Bromwasserstoff gesättigtem Eisessig erreichen. Die Massenspektren von O-Acetyl-Serin enthaltenden TFA-Di-, Tri- und Tetrapeptidestern sind bei Temperaturen unter 200° C im Feststoffeinlaßsystem des

Massenspektrometers verdampfbar und zeigen relativ intensive Molekularpeaks in ihren Spektren. Höhere Peptide mit O-Acetyl-Serin wurden bisher nicht untersucht.

Keine besonderen Schutzgruppen werden für die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure benötigt. Die freien Carboxylgruppen werden gleichzeitig mit der Carboxylgruppe am Peptidende verestert. Analog dazu werden die freien Aminogruppen bei Lysin oder Ornithin enthaltenden Peptiden trifluoracetyliert.

Tabelle 1

Untersuchte TFA-Derivate:

TFA-Aminosäureester:

1.) TFA-Gly-OMe
2.) TFA-Ala-OMe
3.) TFA-Val-OMe
4.) TFA-Leu-OMe
5.) TFA-Ile-OMe
6.) TFA-Ser-OMe
7.) TFA-Thr-OMe
8.) TFA-Cys-OMe
9.) TFA-Met-OMe
10.) TFA-Pro-OMe
11.) TFA-Phe-OMe
12.) TFA-Tyr-OEt
13.) TFA-His-OMe
14.) TFA-Try-OMe
15.) TFA-Glu-$(OMe)_2$
16.) TFA-Asp-$(OMe)_2$
17.) TFA-Asn-OMe
18.) TFA-Gln-OMe
19.) $(TFA)_2$-Lys-OMe
20.) $(TFA)_2$-Orn-OMe
21.) TFA-Cys(Bzl)-OEt
22.) TFA-Tyr(OMe)-OMe

TFA-Dipeptidester:

1.) TFA-Gly-Ala-OMe
2.) TFA-Ala-Gly-OMe
3.) TFA-Leu-Gly-OMe
4.) TFA-Gly-Leu-OMe
5.) TFA-Gly-Val-OMe
6.) TFA-Ala-Ala-OMe
7.) TFA-Leu-Leu-OMe
8.) TFA-Ala-nVal-OMe
9.) TFA-Ala-Met-OMe
10.) TFA-Leu-Ala-OMe
11.) TFA-Val-Val-OMe
12.) TFA-Ala-Val-OMe
13.) TFA-Val-Gly-OMe
14.) TFA-Ala-Leu-OMe
15.) TFA-Ala-Phe-OMe
16.) TFA-Leu-Phe-OMe
17.) TFA-Phe-Phe-OMe
18.) TFA-Gly-Try-OMe
19.) TFA-Try-Leu-OMe
20.) TFA-Leu-Try-OMe
21.) TFA-Pro-Leu-OMe
22.) TFA-Gly-Tyr-OMe
23.) TFA-Gly-Tyr-$(OMe)_2$
24.) TFA-Gly-Asp-$(OMe)_2$
25.) TFA-His-Ala-OMe
26.) TFA-Leu-Tyr-OMe
27.) TFA-α-Glu-Tyr-OMe
28.) TFA-ß-Ala-His-OMe
29.) TFA-Tyr-Ile-OMe
30.) TFA-Ile-Ser-OMe
31.) TFA-Ser-Asp-$(OMe)_2$
32.) TFA-Gly-Ser(Ac)-OMe
33.) TFA-Val-Ser(Ac)-OEt
34.) TFA-Gly-Asn-OMe
35.) TFA-Cys(Bzl)-Gly-OEt
36.) TFA-Cys(Bzl)-Ala-OEt
37.) TFA-Cys(Bzl)-Val-OEt
38.) TFA-Cys(Bzl)-Val-OMe
39.) TFA-Cys(Bzl)-Ile-OMe
40.) TFA-Ser(Ac)-Cys(Bzl)-OEt
41.) TFA-Cys(Bzl)-Pro-OMe
42.) TFA-Cys(Bzl)-Tyr-OMe
43.) TFA-Cys(p-Cl-Bzl)-Val-OMe
44.) TFA-Asn-Cys(Bzl)-OBzl

TFA-Oligopeptidester:

1.) TFA-Ala-Gly-Gly-OMe
2.) TFA-Leu-Gly-Gly-OMe
3.) TFA-Gly-Gly-Leu-OMe
4.) TFA-Ala-Leu-Ala-OMe
5.) TFA-Val-Val-Val-OMe

6.) TFA-Pro-Leu-Gly-OMe
7.) TFA-Gly-Phe-Ala-OMe
8.) TFA-Pro-Gly-Phe-OMe
9.) TFA-Gly-Leu-Tyr-OMe
10.) TFA-γ-Glu-Cys-Gly-$(OMe)_2$
11.) TFA-γ-Glu-Cys(Bzl)-Gly-$(OMe)_2$
12.) TFA-Gly-Ala-Cys(Bzl)-OEt
13.) TFA-Ala-Cys(Bzl)-Ala-OEt
14.) TFA-His-Ala-Cys(Bzl)-OEt
15.) TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-OMe
16.) TFA-Cys(Bzl)-Tyr-Ile-OMe
17.) TFA-Thr-Cys(Bzl)-Ile-OMe
18.) TFA-Cys(Bzl)-Pro-Val-OMe
19.) TFA-Cys(Bzl)-Ala-Ser(Ac)-OEt
20.) TFA-β-Asp-Cys(Bzl)-Gly-$(OEt)_2$
21.) TFA-Ser(Ac)-Cys(Bzl)-Gly-OEt
22.) TFA-Gly-Asn-Cys(Bzl)-OMe
23.) TFA-Gly-Asn-Cys(Bzl)OBzl
24.) TFA-Ser-Asp-Cys(Bzl)-$(OMe)_2$
25.) TFA-Gly-Ala-Cys(Bzl)-Ala-OEt
26.) TFA-Val-Cys(Bzl)-Pro-Val-OMe
27.) TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-OMe
28.) TFA-Val-Ser-Cys(Bzl)-Gly-OEt
29.) TFA-Asp-Cys(Bzl)-Pro-Leu-$(OMe)_2$
30.) TFA-Ala-Gly-Asn-Cys(Bzl)-OEt
31.) TFA-Gly-Pro-Ala-Leu-Pro-OMe
32.) TFA-Ala-Pro-Val-Gln-Glu-$(OMe)_2$
33.) TFA-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-OMe

Die bei den einzelnen Aminosäuren möglichen Störreaktionen und deren Vermeidung durch Schutzgruppen sind in Tabelle 2 noch einmal zusammengefaßt.

Tabelle 2:

Aminosäure	Störreaktion	Vermeidung der Störreaktion
Cystein	ß-Eliminierung von H_2S, Oxydation	S-Benzylierung
Serin, Threonin	H_2O-Abspaltung	O-Acetylierung
Asparagin, Glutamin	Verseifung der Säureamidgruppe	Veresterung mit Diazomethan
Asparaginsäure Glutaminsäure	Freie Carboxylgruppe	Veresterung
Lysin, Ornithin	Freie Aminogruppe	Trifluoracetylierung
Tryptophan	Zersetzung in saurem Medium	Veresterung mit Diazomethan

II. Massenspektrometrie und Gas-Chromatographie von TFA-Peptidestern

1. Ableitung der Aminosäuresequenz aus dem Massenspektrum eines TFA-Peptidesters

Einen Überblick über die untersuchten TFA-Derivate gibt die Tabelle 1. Die Ableitung der Sequenz aus dem Massenspektrum eines TFA-Peptidesters läßt sich am besten an Hand eines typischen Beispiels zeigen (Abb. 1).

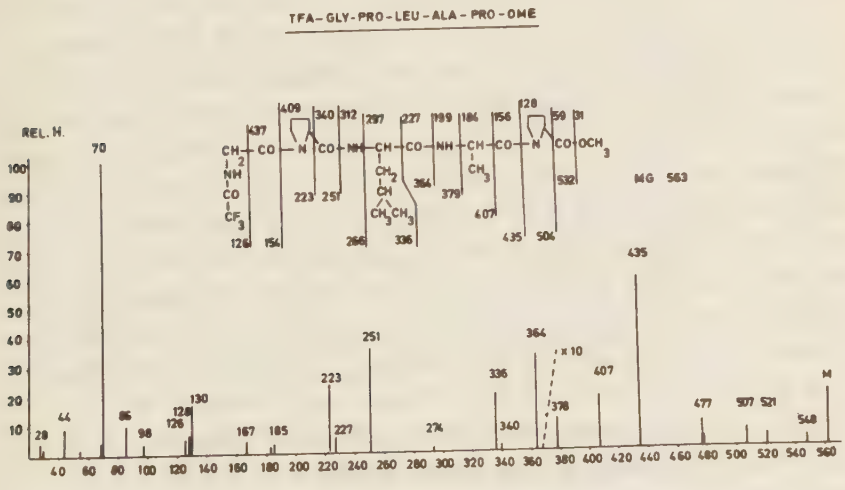


Abb. 1

Massenspektrum und Fragmentierungsschema von TFA-Gly-Pro-Leu-Ala-Pro-OMe.
LKB 9000 Massenspektrometer, Direkteinlaßsystem, 50 eV, 250° Ionenquellentemperatur, 135° Probenhaltertemperatur.

Die Fragmentierung tritt besonders auf beiden Seiten der Carbonylgruppen der Peptidbindungen auf. Die dabei entstehenden "sequenzspezifischen" Ionen sind für die Ableitung der Aminosäuresequenz von höchster Wichtigkeit. Im Beispiel sind es die Ionen bei m/e 223, 227, 251, 336, 340, 364, 407 und 435 (Abb. 1). Auch die endständigen Aminosäuren geben sich durch charakteristische Ionen zu erkennen, die am Aminoende durch den TFA-Rest, am Carboxylende durch die Estergruppe "markiert" sind. Aminoendständiges Glycin wird durch das Ion bei m/e 126 angezeigt. Für carboxylendständiges Prolin spricht das Ion bei m/e 128 und das zweifach protonisierte Ion m/e 130. Eine dritte Gruppe von Ionen, die allerdings primär nur über das Vorhandensein einer Aminosäure und nicht über die Stellung in der Sequenz Auskunft geben, sind die Immoniumionen $H_2\overset{\oplus}{N}{=}CHR$. Durch die Bildung von metastabilen Ionen bei ihrer Entstehung geben sie jedoch oft einen Hinweis auf die Position der zugehörigen Aminosäure in der Sequenz[5]. In Abb. 1 sind die Immoniumionen die Ionen m/e 44 für Alanin, m/e 70 für Prolin und m/e 86 für Leucin. Mit diesen drei Arten von Ionen, den sequenzspezifischen Ionen, den Ionen, die über die endständigen Aminosäuren Auskunft geben und den Immoniumionen ist das Massenspektrum eines einfachen, nur bifunktionelle, aliphatische Aminosäuren enthaltenden Peptides erklärt.

Bei mehrfunktionellen Aminosäuren und solchen mit aromatischen oder heterocyclischen Seitenketten tritt in den Massenspektren eine weitere Gruppe

von charakteristischen Ionen auf, die durch Eliminierung von Teilen der Seitenketten entstehen und über die Stellung der Aminosäure in der Sequenz keine Aussage machen.

2. Massenspektrometrische Untersuchungen an Cysteinpeptiden

Im Rahmen der Untersuchungen von E. Bayer und Mitarbeitern[21,22] über das Eisenproteid Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum wurden von G. Jung[18,19] eine Reihe von Modellpeptiden synthetisiert. Diese Di-, Tri- und Tetrapeptide, die S-benzyliertes Cystein enthielten (s. Tab. 3), eigneten sich hervorragend für erste massenspektrometrische Untersuchungen, über die schon früher berichtet wurde[23]. Vor allem fiel die große Stabilität dieser Verbindungen auf, die sich ohne Schwierigkeit trifluoracetylieren und, wie die letzte Spalte in Tab. 3 zeigt, bei Temperaturen bis 210° C unzersetzt verdampfen ließen. In Tab. 3 sind außerdem die relativen Intensitäten der charakteristischen Massenzahlen sowie die der Molekularionen angegeben.

Die Gesetzmäßigkeiten, die bei Untersuchungen von TFA-Peptidestern mit aliphatischen Aminosäuren gefunden wurden, werden durch das Vorhandensein von S-Benzyl-Cystein in der Sequenz im Prinzip nicht verändert. Besonders auffallend sind jedoch Ionen, die durch Fragmentierung der S-Benzyl-Seitenkette entstehen. Dies wird durch die Elektronenanhäufung in der aromatischen Seitenkette verursacht. Auch

Tabelle 3:

CHARAKTERISTISCHE PEAKS EINIGER S-BENZYL-CYSTEINYLPEPTIDE

VERBINDUNG	RELATIVE INTENSITÄTEN IN % BEZOGEN AUF INTENSIVSTEN PEAK										TEMPERATUR DES PRO-BENHALTERS BEI VERDAMPFUNG (ca. 10^{-7} TORR)
	m/e 91	m/e M-91	m/e 123	m/e 124	m/e 137	m/e 149	m/e 166	m/e 176	m/e 177	m/e M	
TFA-CYS(BZL)-GLY-OEt[+]	100	14	8	3	4	3	-	8	2	4	ca. 50°C
TFA-CYS(BZL)-ALA-OEt[+]	100	23	6	4	6	3	1	5	6	6	ca. 50°C
TFA-CYS(BZL)-VAL-OEt[+]	100	27	6	4	4	3	2	3	10	7	ca. 60°C
TFA-CYS(BZL)-ILE-OMe[+]	100	16	5	5	6	3	2	3	6	2	ca. 50°C
TFA-SER(AC)-CYS(BZL)-OEt	100	10	5	4	9	11	6	8	-	4	ca. 80°C
TFA-GLY-ALA-CYS(BZL)-OEt	100	13	1	10	3	3	7	4	-	1	ca. 80°C
TFA-SER(AC)-CYS(BZL)-GLY-OEt	100	20	5	6	5	12	11	15	-	6	ca. 160°C
TFA-THR-CYS(BZL)-ILE-OMe	100	17	3	6	3	8	9	5	8	2	ca. 85°C
TFA-HIS-ALA-CYS(BZL)-OEt	93	33	3	16	3	2	-	-	-	4	160-180°C
TFA-ALA-CYS(BZL)-ALA-OEt	91	26	4	5	2	7	8	5	6	3	ca. 80°C
TFA-CYS(BZL)-PRO-VAL-OMe	100	6	9	4	10	4	-	3	2	2	ca. 70°C
TFA-CYS(BZL)-ALA-SER(AC)-OEt	100	11	7	7	6	5	-	16	10	2	ca. 80°C
TFA-ASP-CYS(BZL)-GLY(OEt)$_2$	100	4	6	5		6	6	10	5	1	ca. 150°C
TFA-GLY-ALA-CYS(BZL)-ALA-OEt	96	17	4	10	2	4	19	4	5	2	180-200°C
TFA-VAL-SER(AC)-CYS(BZL)-GLY-OEt	100	15	5	8	3	6	26	18	-	2	ca. 190°C
TFA-VAL-CYS(BZL)-PRO-VAL-OMe	73	18	6	6	-	7	16	2	8	5	ca. 200°C
TFA-ALA-GLY-ASN-CYS(BZL)-OEt	100	3,5	3	12	-	3	3	2	-	1	ca. 210°C

[+] GASCHROMATOGRAPHISCH UNTERSUCHT

bei anderen aromatischen und heterocyclischen Aminosäuren treten Ionen der Seitenkette in auffallend hoher Intensität auf[5]. Bei fast allen untersuchten Cys(Bzl)-Peptid-Derivaten ist der Peak bei m/e 91 ($C_7H_7^+$) der größte. Auch ein Peak bei Massenzahl M-91 zeichnet sich in allen Fällen durch große Intensität aus. Die weiteren auf den S-Benzyl-Rest zurückzuführenden Ionen sind in Tabelle 4 interpretiert; die relativen Intensitäten für die einzelnen Beispiele sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Ionen in Tabelle 4 wurden ähnlich wie bei K. Heyns und H. F. Grützmacher[37,38] formuliert.

Tabelle 4:

Auf den S-Benzyl-Rest zurückzuführende Fragmentionen:

m/e 123	$(C_6H_5-CH_2-S)^+$
m/e 124	$(C_6H_5-CH_2-SH)^+$
m/e 137	$(C_6H_5-CH_2-S-CH_2)^+$
m/e 149	$(C_6H_5-CH=S=CH-CH_2)^+$
m/e 166	$(C_6H_5-CH_2-S-CH_2-CH=NH_2)^+$
m/e 176	$(C_6H_5-CH=S=CH-CH=C=O)^+$
m/e 177	$(C_6H_5-CH_2-S=CH-CH=C=O)^+$

Weitere charakteristische Ionen, bei denen die positive Ladung am Molekülrest verbleibt, finden sich in fast allen untersuchten Fällen, besonders bei M-123 (Abspaltung von $C_6H_5-CH_2-S$) und bei M-122 (Abspaltung von $C_6H_5-CH=S$).

Um den angenommenen Fragmentierungsmechanismus eindeutig zu beweisen, wurden an zwei Cystein-Peptiden das benzylierte Derivat und die entsprechende p-Cl-Benzyl-Verbindung untersucht. Dabei tritt bei allen Fragmentionen, die den S-Benzyl-Rest enthalten, eine Verschiebung um 34 bzw. 36 Masseneinheiten zu höheren Massen hin auf, entsprechend den beiden Cl-Isotopen Cl^{35} und Cl^{37}. Das typische Isotopenverhältnis von Cl^{35} zu Cl^{37}, das etwa dem Verhältnis 3 : 1 entspricht, erleichterte im Massenspektrum das Auffinden der Ionen, die den p-Cl-Benzyl-Rest enthalten. In Abb. 2 und Abb. 3 sind die Massenspektren von TFA-γ-Glu-Cys(Bzl)-Gly-OMe und TFA-γ-Glu-Cys(p-Cl-Bzl)-Gly-OMe dargestellt. Die sich entsprechenden Ionen sind gekennzeichnet. Die Benzylierung des freien Peptids wurde mit Benzylchlorid in flüssigem NH_3, bei der Cl-Verbindung entsprechend mit p-Cl-Benzylchlorid, durchgeführt.

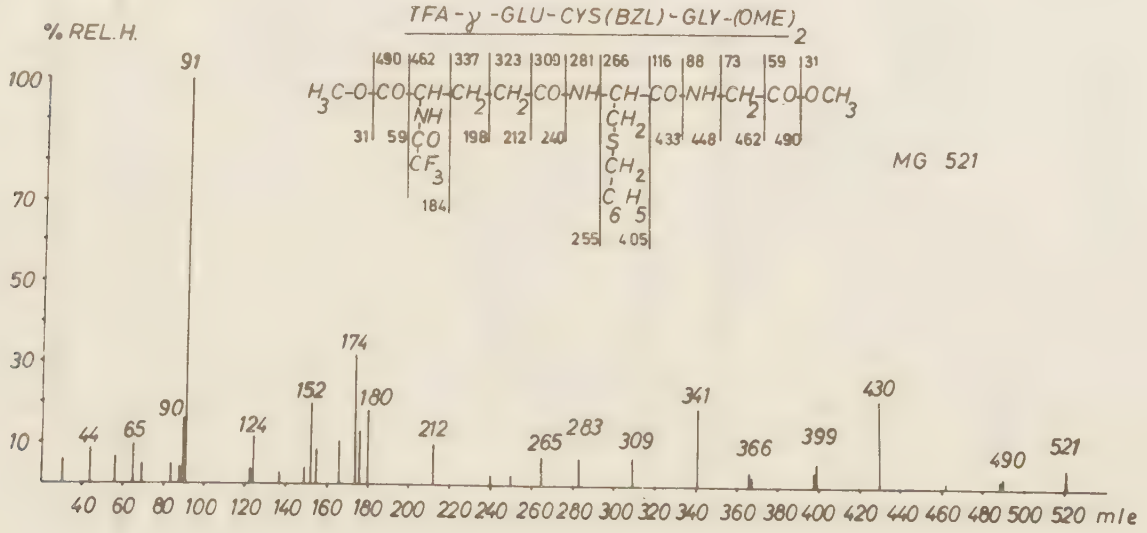


Abb. 2

Massenspektrum von TFA - γ - Glu - Cys(Bzl)-Gly-$(OMe)_2$ LKB 9 000 Massenspektrometer Direkteinlaßsystem; 50 eV, 250° Ionenquellentemperatur, 150° Probenhalter.

Tabelle 5:

Interpretation der Ionen in Abb. 2:

m/e	Mögliche Formulierung der Fragmentionen	Entsprechendes Ion in Abb. 3
521	M	555
490	$M-CH_3O$	524
462	$M-COOCH_3$	
430	$M-C_6H_5-CH_2$	
399	$M-C_6H_5-CH=S$	
398	$M-C_6H_5-CH_2-S$	
367	$M-(CH_3O+C_6H_5-CH_2-S)$	
366	$M-(CH_3OH+C_6H_5-CH_2-S)$	
341	$H_3C-O-CO-\underset{\displaystyle NH-CO-CF_3}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2-CH_2-CO-NH-\underset{\displaystyle CH_2-S}{\underset{\vert}{C}}=C=O$	
309	$H_3C-O-CO-\underset{\displaystyle NH-CO-CF_3}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2-CH_2-CO-NH-\underset{\displaystyle CO}{\underset{\vert}{C}}=CH_2$	
283	$CF_3-CO-NH=CH-CH_2-CH_2-CO-NH-\underset{\displaystyle CH_2-SH}{\underset{\vert}{C}}=C=O$	
265	$C_6H_5-CH_2-S-CH=CH-CO-NH-CH_2-COOCH_3$	299
240	$H_3CO-CO-\underset{\displaystyle NH-CO-CF_3}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2-CH_2-CO$	
212	$H_3CO-CO-\underset{\displaystyle NH-CO-CF_3}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2-CH_2$	
180	$212-CH_3OH$	
174	$265-C_6H_5-CH_2$	
152	180-CO	
176	Siehe Tabelle 4!	210
166		200
149		183
137		
124		158
123		157
91		125
90	$H_2N=CH-COOCH_3$	

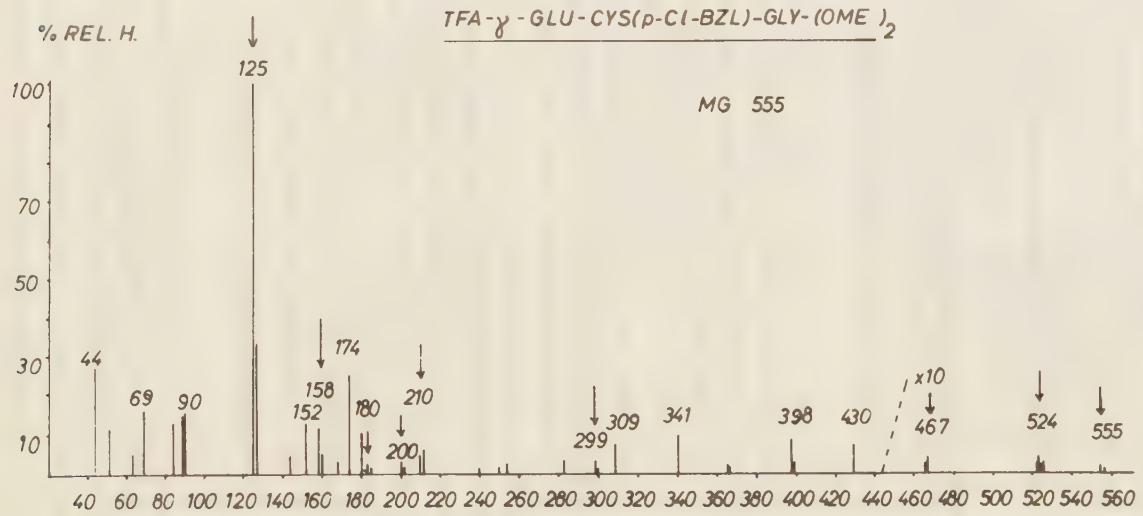


Abb. 3

Massenspektrum von TFA - γ - Glu - Cys(p-Cl-Bzl)-Gly-$(OMe)_2$ LKB 9 000 Massenspektrometer, Direkteinlaßsystem, 50 eV, 250° Ionenquellentemperatur, 150° Probenhalter.

Besonders wichtig für die Ableitung der Sequenz sind die Ionen, die bei N-terminaler bzw. C-terminaler Stellung von S-Benzyl-Cystein auftreten. In den Abbildungen 4 und 5 ist je ein Beispiel dafür wiedergegeben.

a) N-terminales S-Benzyl-Cystein

Bei S-Benzyl-Cystein am Aminoende einer Sequenz tritt regelmäßig ein Ion der Massenzahl 172 auf, das wahrscheinlich der Formulierung $CF_3-CO-\overset{\oplus}{N}H=CH-CH_2-SH$ entspricht. Bei m/e 262 ($CF_3-CO-\overset{\oplus}{N}H=CH-CH_2-S-CH_2-C_6H_5$) wurde dagegen in keinem Fall ein Peak von bemerkenswerter Höhe festgestellt. Charakteristisch für S-Benzyl-Cystein in N-terminaler Stellung sind auch Ionen bei Massenzahl M-113 (Abspaltung von $CF_3-CO-NH_2$) und M-204 (Abspaltung von $CF_3-CO-NH_2+C_6H_5-CH_2$). Der aufeinanderfolgende Zerfall $M^+ \longrightarrow (M-113)^+ \longrightarrow (M-204)^+$ ließ sich aus metastabilen Ionen in mehreren Fällen berechnen und wurde ausschließlich bei TFA-Peptidestern mit aminoendständigem S-Benzyl-Cystein beobachtet (s. Tab. 6!).

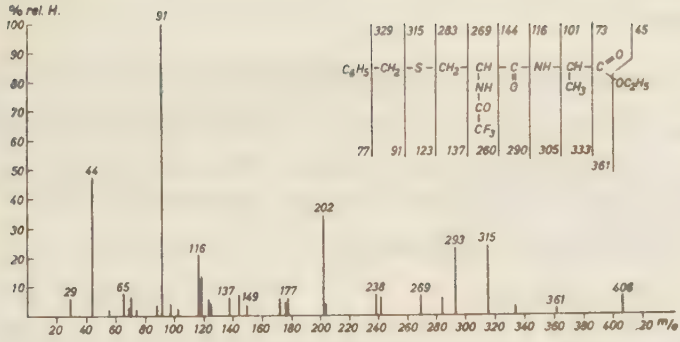
b) S-Benzyl-Cystein in der Sequenz

In diesem Fall wurden Ionen der Form (I) und (II) in größerer Intensität beobachtet. Sie scheinen besonders stabilisiert zu sein.

$$(C_6H_5-CH_2-S-CH=CH-CO-\left(NH-\underset{R}{CH}-CO\right)_n OR)^+ \qquad (I)$$

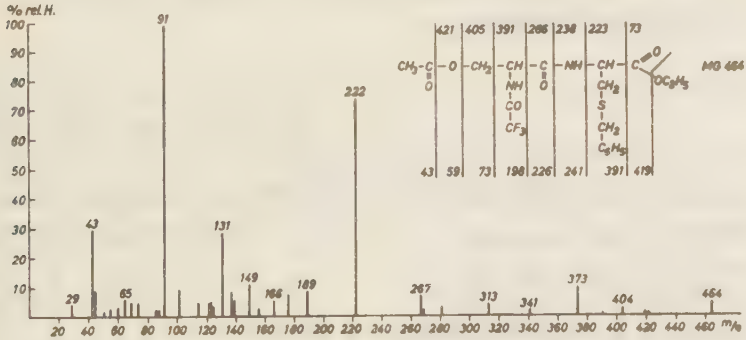
$$(S-CH=CH-CO-\left(NH-\underset{R}{CH}-CO\right)_n OR)^+ \qquad (II)$$

Diese Ionen lassen einen eindeutigen Schluß über die Stellung des S-Benzyl-Cystein in der Sequenz von höheren Peptiden zu. In Tabelle 7 sind die relativen



m/e		m/e		m/e	
406	M	238	M-(C_6H_5-CH_2-S+OC_2H_5)	124	C_6H_5-CH_2-SH
361	M − OC_2H_5	202	M-(CF_3-CO-NH_2+C_6H_5-CH_2)	123	C_6H_5-CH_2-S
333	M − $COOC_2H_5$	177	C_6H_5-CH_2-S=CH=CH=C=O	118	H_2N-CH(CH_3)-$COOC_2H_5$
315	M − C_6H_5-CH_2	176	C_6H_5-CH=S=CH=CH=C=O	116	H_2N=C(CH_3)-$COOC_2H_5$
293	M − CF_3-CO-NH_2	172	HS-CH_2-CH=NH-CO-CF_3	97	CF_3-CO
284	M − C_6H_5-CH=S	149	C_6H_5-CH_2-S=C=CH_2	44	H_2N=CH-CH_3
283	M − C_6H_5-CH_2-S	144	CO-NH-CH(CH_3)-$COOC_2H_5$		
269	M − C_6H_5-CH_2-S-CH_2	137	C_6H_5-CH_2-S-CH_2		

Abb. 4. Massenspektrum, Fragmentierungsschema und Fragmentionen von TFA-Cys(BZL)-Ala-OEt, Massenspektrometer LKB 9000. Elektronenenergie: 50 eV. Ionenquellentemperatur: 270 °C.



m/e		m/e		m/e	
464	M	313	M − (C_6H_5-CH_2+CH_2COOH)	166	H_2N=CH-CH_2-S-CH_2-C_6H_5
421	M − CH_3-CO	281	M − (C_6H_5-CH_2-S+CH_2COOH)	158	HO-CH_2-CH=NH-CO-CF_3
419	M − OC_2H_5	267	M − (C_6H_5-CH_2-SH+$COOC_2H_5$)	149	C_6H_5-CH_2-S=C=CH_2
404	M − CH_2COOH	269	M − (C_6H_5-CH=S+$COOC_2H_5$)	131	S-CH=CH-$COOC_2H_5$
391	M − $COOC_2H_5$	223	C_6H_5-CH_2-S-CH_2CH-$COOC_2H_5$	123	C_6H_5-CH_2S
373	M − C_6H_5-CH_2	222	C_6H_5-CH_2-S-CH=CH-$COOC_2H_5$	60	CH_2COOH
341	M − C_6H_5-CH_2-S	189	CO-NH-CH-$COOC_2H_5$		
342	M − C_6H_5-CH=S		CH_2-S-CH_2		

Abb. 5. Massenspektrum, Fragmentierungsschema und Fragmentionen von TFA-Ser(Ac)-Cys(BZL)-OEt. Massenspektrometer: LKB 9000. Elektronenenergie: 50 eV. Ionenquellentemperatur: 270 °C.

Intensitäten dieser Ionen für mehrere Beispiele angegeben.

c) C-terminales S-Benzyl-Cystein

Bei carboxyl-endständigem S-Benzyl-Cystein treten bei allen untersuchten Beispielen Ionen der Form (III) und (IV) in meist auffallender Intensität auf.

$(C_6H_5-CH_2-S-CH=CH-COOR)^+$ (III)

$(S-CH=CH-COOR)^+$ (IV)

Diese Ionen ergeben bei Methylestern Peaks bei m/e 208 bzw. m/e 117, bei Äthylestern Peaks bei m/e 222 bzw. m/e 131 (s. Tab. 8).

Tabelle 6:

Intensität einiger charakteristischer Peaks bei N-terminalem Cystein:

Peptid-Derivat	Relative Intensität (%)		
	m/e 172	(M-113)	(M-204)
TFA-Cys(Bzl)-Gly-OEt	7	23	31
TFA-Cys(Bzl)-Ala-OEt	6	23	33
TFA-Cys(Bzl)-Val-OEt	7	12	32
TFA-Cys(Bzl)-Ile-OMe	6	7	24
TFA-Cys(Bzl)-Pro-Val-OMe	7	1	2
TFA-Cys(Bzl)-Ala-Ser(Ac)-OEt	3	1	4
TFA-Cys(Bzl)-Pro-OMe	1	5	32
TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-OMe	1	2	6,2
TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-OMe	3	1,4	8,6

Tabelle 7:

Intensitäten der charakteristischen Peaks bei Cystein in der Sequenz:

Peptid-Derivat	Relative Intensität(%) Ion (I)	Ion (II)
TFA-Ala-Cys(Bzl)-Ala-OEt	6	31
TFA-Thr-Cys(Bzl)-Ile-OMe	4	42
TFA-Gly-Ala-Cys(Bzl)-Ala-OEt	5	30
TFA-ß-Asp-Cys(Bzl)-Gly-$(OEt)_2$	10	48
TFA-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-OMe	6	13
TFA-Val-Ser(Ac)-Cys(Bzl)-Gly-OEt	11	50
TFA-γ-Glu-Cys(Bzl)-Gly-$(OMe)_2$	7	32
TFA-Val-Cys(Bzl)-Pro-Val-OMe	2	11

Tabelle 8:

Intensitäten der charakteristischen Peaks bei C-terminalem Cystein:

Peptid-Derivat	Relative Intensität (%) Ion (III)	Ion (IV)
TFA-Ser(Ac)-Cys(Bzl)-OEt	75	28
TFA-Gly-Ala-Cys(Bzl)-OEt	22	12
TFA-His-Ala-Cys(Bzl)-OEt	2	5
TFA-Ala-Gly-Asn-Cys(Bzl)-OEt	9	6
TFA-Gly-Asn-Cys(Bzl)-OMe	8	2
TFA-Ser-Asp-Cys(Bzl)-$(OMe)_2$	29	12

Eine große Hilfe bei der Sequenzableitung ist auch das Erkennen des Molekularions. Es tritt in allen untersuchten Fällen mit ungewöhnlich großer Intensität auf (s. Tab. 3). Dies dürfte auf den aromatischen Molekülanteil des Benzylrestes zurückzuführen sein und spricht wiederum für die Stabilität dieser S-Benzyl-Cystein-Derivate. Bei Peptiden ohne aromatischen Molekülanteil liegt die Intensität des Molekularions oft sogar unterhalb der Nachweisgrenze, während hier Intensitäten bis zu 7 % erreicht werden. Dies erleichtert die Deutung der Massenspektren erheblich.

Eine Übersicht über die Fragmentierung mit Interpretation aller wichtigen Ionen ist in Abb. 4 für ein Peptid mit N-terminalem S-Benzyl-Cystein und in Abb. 5 für ein Peptid mit C-terminalem S-Benzyl-Cystein angeführt.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen von TFA-Cys(Bzl)-Peptidestern lassen erkennen, daß sich diese Derivate zur Sequenzbestimmung von Cysteinpeptiden eignen. Die angeführten Beispiele zeigen, daß eine Feststellung von N- und C-terminalem Cystein sowie der Position von Cystein in einer Peptidkette möglich ist.

3. Massenspektrometrische Untersuchungen an Asparagin- und Glutaminpeptiden

Wie schon in der Einleitung bemerkt wurde, liegen bisher keine Untersuchungen von Peptiden mit Asparagin oder Glutamin vor. Diese Aminosäuren verringern wegen ihrer stark polaren Säureamidgruppen die Flüchtigkeit der TFA-Derivate erheblich. So konnten bisher auch

noch keine derartigen Verbindungen gaschromatographisch untersucht werden. Es gelang jedoch, unter Anwendung des Direkteinlaßsystems Asparagin und Glutamin enthaltende TFA-Peptidester zu verdampfen und ihre Massenspektren aufzunehmen. In Tab. 9 sind die untersuchten TFA-Derivate zusammengefaßt.

Tabelle 9:

TFA-Gly-Asn-OMe
TFA-Asn-Cys(Bzl)-OBzl
TFA-Gly-Asn-Cys(Bzl)-OEt
TFA-Ala-Gly-Asn-Cys(Bzl)-OEt
TFA-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-OMe
TFA-Ala-Pro-Val-Gln-Glu-$(OMe)_2$ [20]

Die Bedeutung dieser Untersuchungen liegt weniger darin, Sequenzen größerer Peptide mit Asparagin und Glutamin aufzuklären, als in der Möglichkeit, die Synthesen solcher Peptide zu kontrollieren. Bei der sauren Partialhydrolyse werden die Säureamidgruppen von Asparagin und Glutamin fast quantitativ verseift. Als Endprodukte treten in den Hydrolysaten die entsprechenden Asparaginsäure- bzw. Glutaminsäure-Peptide auf.

Die Auswertung der Massenspektren ließ in Übereinstimmung mit den allgemeinen Regeln bei der Fragmentierung von TFA-Peptidestern auch bei Asparagin-Peptiden charakteristische Bruchstücke erkennen. Bei N-terminalem Asparagin tritt ein Ion m/e 183 auf (CF_3-CO-$\overset{+}{N}$H=CH-CH_2-CO-NH_2). Durch Abspaltung von 43 und 44 Masseneinheiten (H-N=C=O bzw. H_2N-CO)

treten Peaks bei m/e 140 und m/e 139 auf. Bei C-terminalem Asparagin wurde ein Ion der Massenzahl 145 ($H_2N\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}\overset{\overset{+}{N}H_2}{\underset{COOCH_3}{C}}=$) beobachtet.

Durch das Auftreten von sehr intensiven Ionen der Form (V) und (VI) kann Asparagin auch innerhalb einer Sequenz fixiert werden.

$$CF_3\text{-}CO\text{-}NH\text{-}(\underset{R}{CH}\text{-}CO\text{-}\overset{+}{N}H)_n\text{=}CH\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}NH_2 \qquad (V)$$

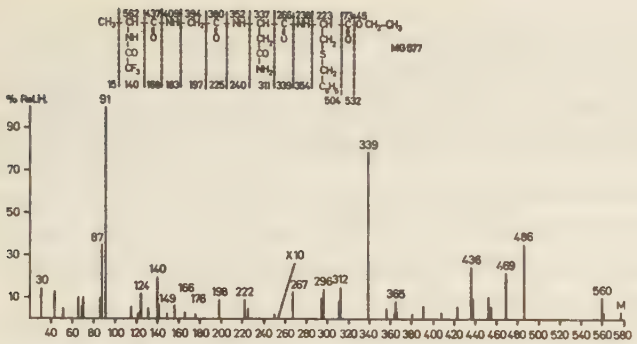
$$CF_3\text{-}CO\text{-}NH\text{-}(\underset{R}{CH}\text{-}CO\text{-}NH)_n\text{-}\underset{CO^+}{CH}\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}NH_2 \qquad (VI)$$

Analoge Ionen wurden auch in dem untersuchten Glutaminpeptid in großer Intensität beobachtet.

Ionen, die über die Stellung in der Kette keine direkte Aussage machen, sind die Immoniumionen $H_2\overset{+}{N}=CH\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}NH_2$ bei m/e 87 (Asn) und m/e 101 (Gln). Im oberen Massenbereich treten Ionen bei M-17 (Abspaltung von NH_3) auf, die ebenfalls das Vorhandensein von Amidgruppen erkennen lassen. In Abb. 6 ist als Beispiel für ein Asparaginderivat das Massenspektrum von TFA-Ala-Gly-Asn-Cys(Bzl)-OEt mit Fragmentierungsschema und Interpretation der wichtigsten Ionen wiedergegeben.

4. Massenspektrometrische Untersuchungen an Serin-Peptiden

Da ähnlich wie bei Cysteinpeptiden auch bei ungeschütztem Serin Zersetzung z.B. durch H_2O-Eliminierung zu befürchten war, wurden die Serin-Peptide vor der Veresterung und Trifluoracetylierung durch Behandeln mit Bromwasserstoff in Eisessig O-acetyliert. Die



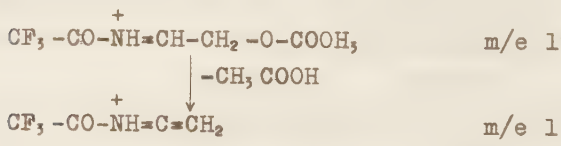
m/e	577	M
	560	$M-NH_3$
	486	$M-C_7H_7$
	469	$M-C_7H_7+NH_3$
	455	$M-C_6H_5-CH=S$
	454	$M-C_6H_5-CH_2-S$
	453	$M-C_6H_5-CH_2-SH$
	438	$M-CH_3-CH=N-CO-CF_3$
	436	$M-CH_3-CH_2-NH-CO-CF_3$
	423	$M-(C_7H_7+NH_3+C_2H_5-OH)$
	339	$CH_3-CH(NH-CO-CF_3)-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH(CH_2-CO-NH_2)-CO$
m/e	312	$CH_3-CH(NH-CO-CF_3)-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CH_2-CO-NH_2$
	267	$CO-NH-CH(CH_2-S-CH_2-C_6H_5)-CO\,OC_2H_5+H$
	225	$CH_3-CH(NH-CO-CF_3)-CO-NH-CH_2-CO$
	222	$C_6H_5-CH_2-S-CH=CH-CO\,OC_2H_5$
	198	$CH_3-CH(NH-CO-CF_3)-CO-NH=CH+H$
	176	$C_6H_5-CH=S-CH=CH-CH=C=O$
	166	$C_6H_5-CH_2-S-CH_2-CH=NH_2$
	131	$S-CH=CH-CO\,OC_2H_5$
	87	$H_2N=CH-CH_2-CO-NH_2$

Abb. 6

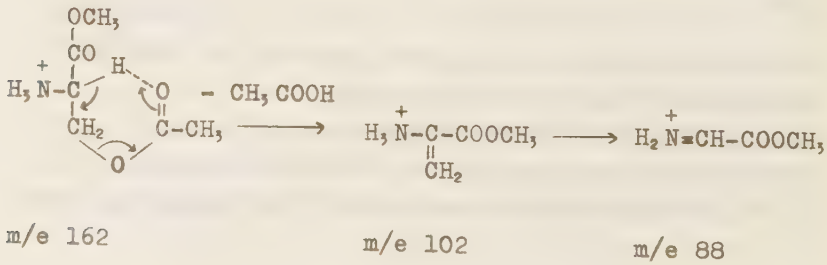
Massenspektrum, Fragmentierungsschema und Interpretation einiger wichtiger Ionen von TFA-Ala-Gly-Asn-Cys(Bzl)-OEt.
LKB 9000 Massenspektrometer, Direkteinlaßsystem, 50 eV, Ionenquellentemperatur 200°, Probenhalter 200°.

Acetylgruppe läßt sich so auf schonendste Art einführen. Peptidspaltungen oder Verseifung von Säureamidgruppen wurden in keinem Fall beobachtet. F. Weygand[15] schlägt für Serin-Peptide die Trimethylsilyl-Schutzgruppe vor. Da jedoch die Flüssigkeits-Chromatographie neben der Gas-Chromatographie als Trennmethode eingesetzt werden sollte, wurde von vornherein auf eine Trimethylsilylierung verzichtet. Die Trimethylsilylderivate sind gegen Feuchtigkeit sehr empfindlich.

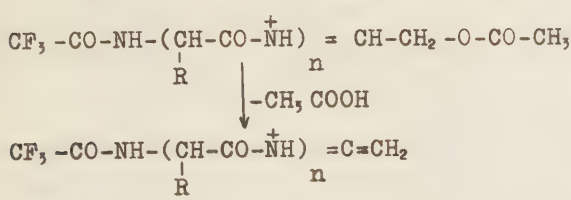
Kennzeichnend für aminoendständiges O-Acetyl-Serin ist ein Ion m/e 138, das sich aus dem eigentlich zu erwartenden, jedoch nicht beobachteten Ion m/e 198 durch Abspaltung von CH_3COOH bilden dürfte:



Bei C-terminalem O-Acetyl-Serin tritt bei Äthylestern ein Peak bei m/e 160 auf, bei Methylestern ein entsprechender Peak bei m/e 146 $(CH_3-CO-O-CH_2-CH_2-COOCH_3)^+$. Weiterhin wurden intensive Peaks bei m/e 115 und 116 bei Äthylestern bzw. 101 und 102 bei Methylestern beobachtet, die man sich aus dem nicht auftretenden Ion bei m/e 162 entstanden denken kann. Der weitere Zerfall führt zu m/e 88 (bzw. 102 bei Äthylestern):



Steht O-Acetyl-Serin innerhalb einer längeren Peptidkette, so treten auch hier wieder sequenzspezifische Ionen der Form (VII) auf, die aus den ursprünglichen Fragmenten durch Eliminierung von CH_3COOH entstehen:



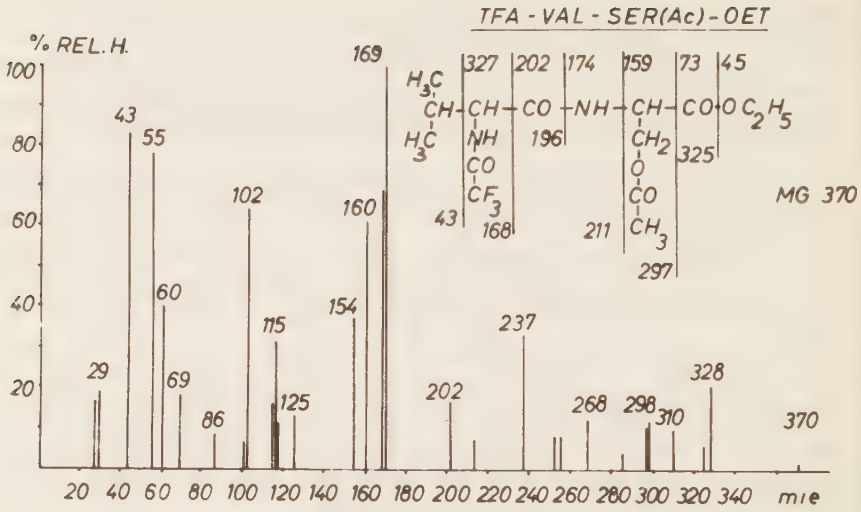
(VII)

Im oberen Massenbereich ist das Ion, das der Massenzahl M-60 entspricht (Abspaltung von CH_3COOH), besonders auffallend. Die Abbildungen 5 und 7 zeigen Beispiele für O-Acetyl-Serin-Peptide.

5. Gaschromatographische Untersuchungen

Die Retentionszeiten der Gas-Chromatographie haben für sich allein nur geringe Aussagekraft. Erst Vergleichs- und Mischeinspritzungen von unbekannten Verbindungen mit authentischen Vergleichssubstanzen ermöglichen eine Identifizierung. Da dieses Verfahren oft umständlich und zeitraubend ist, wurden in letzter Zeit häufiger Versuche gemacht, die Gas-Chromatographie mit verschiedenen anderen bewährten analytischen Methoden zu koppeln[24].

Zur Kombination mit der Gas-Chromatographie schien die Massenspektrometrie besonders geeignet zu sein. Zur Aufnahme eines Massenspektrums genügen wie zur Aufnahme eines Gas-Chromatogramms sehr kleine Substanzmengen. Zudem ist die Massenspektrometrie eine Analysenmethode, die an Aussagewert die meisten anderen Methoden bei weitem übertrifft.



m/e 370 M

328 $M-CH_2=CH-CH_3$

325 $M-OC_2H_5$

310 $M-CH_3COOH$

297 $M-COOC_2H_5 \xrightarrow{+H}$ 298

268 $M-(CH_2=CH-CH_3+CH_3COOH)$

237 $M-(COOC_2H_5+CH_3COOH)$

202 $CO-NH-\underset{\displaystyle CH_2-O-CO-CH_3}{\underset{|}{CH}}-COOC_2H_5$

168 $H_3C-\underset{H_3C}{\overset{}{CH}}-CH=NH-CO-CF_3 \xrightarrow{+H}$ 169

160 $CH_3-CO-O-CH_2-CH_2-COOC_2H_5$

115 $H_2N-\underset{\displaystyle CH_2}{\underset{\|}{C}}-COOC_2H_5 \xrightarrow{+H}$ 116

102 $H_2N=CH-COOC_2H_5$

Abb. 7: Massenspektrum von TFA-Val-Ser(Ac)-OEt, Fragmentierungsschema und Interpretation der wichtigsten Ionen. LKB 9000 Gas-Chromatograph-Massenspektrometer. Säule: SF96, Kapillare 150 m, 0,8 mm Ø, 190° ; Einspritzblock: 190° , Separator: 270° , Ionenquelle: 290° , 50 eV.

Für die Verbindung der Gas-Chromatographie mit der Massenspektrometrie war die Lösung einiger technischer Probleme nötig, vor allem die Abtrennung des Trägergases von den aus der Säule eluierten Substanzen, um einen Mindestdruck von 10^{-6} bis 10^{-7} Torr in der Ionenquelle zu gewährleisten. Dies gelang mit Hilfe von Molekülseparatoren (R. Ryhage[25,26]).

Besonders bewährt hat sich die Kombination der Gas-Chromatographie mit der Massenspektrometrie vor allem bei der Untersuchung von Aromastoffen (Abb. 8).

Wie schon F. Weygand und Mitarbeiter[2,3,4,15] zeigten, sind auch TFA-Peptidester gaschromatographisch trennbar. In der instrumentellen Kopplung mit der Massenspektrometrie könnte also eine ideale Methode zur Sequenzanalyse vorliegen. In Abb. 9 ist die Trennung eines TFA-Dipeptid-Methylester-Gemisches an einer gepackten Säule dargestellt. Die einzelnen Komponenten wurden auf Grund ihrer Massenspektren zugeordnet.

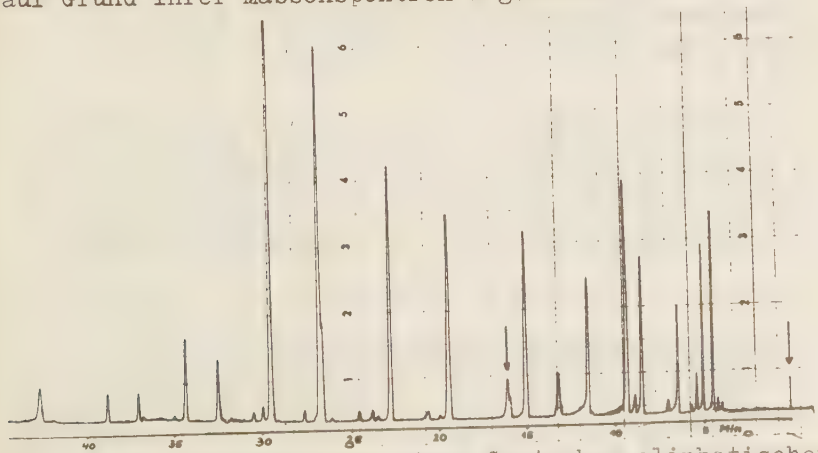


Abb. 8: Gas-Chromatogramm eines Gemisches aliphatischer Alkohole und Carbonsäureester, wie es im natürlichen Rumaroma auftritt. LKB 9000 Gas-Chromatograph-Massenspektrometer. SF96, Kapillare, 20°, 6°/Min. bis 100°. Trägergas: 25 ml He/Min. Detektor: Totalionenstrom.

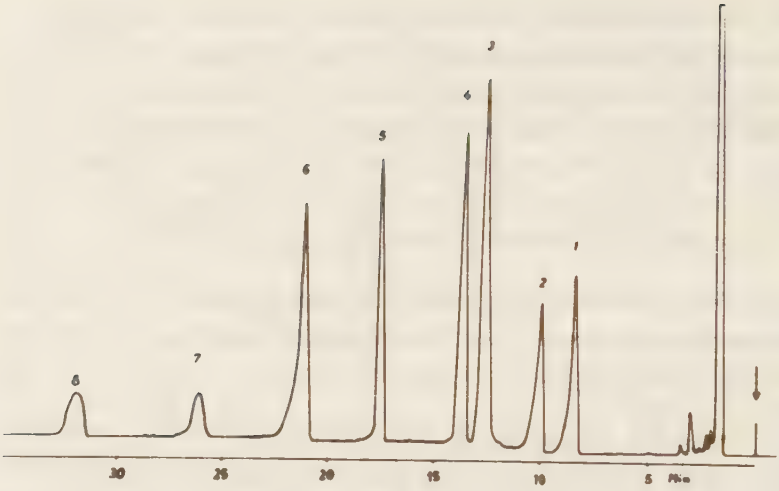


Abb. 9

Gas-Chromatogramm eines Gemisches von TFA-Dipeptid-methylestern. LKB 9000 Gas-Chromatograph-Massen-spektrometer. Säule: 3 m, 1/8" Ø, 20 % SE30. Trägergas: 15 ml He/Min. Säule: 173°, 8°/Min. bis 200°. Einspritzblock: 290°, Separator: 270°.

1 = TFA-Ala-Ala-OMe
2 = TFA-Gly-Ala-OMe
3 = TFA-Ala-Val-OMe
4 = TFA-Leu-Gly-OMe
5 = TFA-Gly-Asp-$(OMe)_2$
6 = TFA-Ala-Met-OMe
7 = TFA-Ala-Phe-OMe
8 = TFA-Leu-Phe-OMe

Zur Verbesserung der Trennleistung wurden auch Versuche mit Kapillarsäulen unternommen. Wie Abb. 10 zeigt, ist die Trennung an der Kapillarsäule wesentlich besser als an der gepackten Säule. Allerdings ist die Anwendung von Säulen so hoher Trennleistung

auf die leichter flüchtigen Dipeptid-Derivate beschränkt. Für Peptide, die mehrere trifunktionelle Aminosäuren enthalten, war eine Trennung nur mit kurzen, gepackten Säulen geringer Belegung möglich.

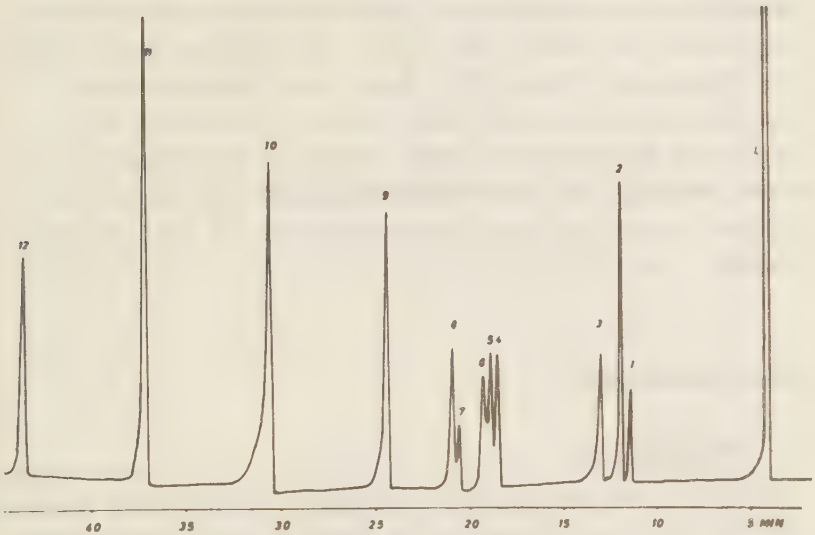


Abb. 10

Gas-Chromatogramm eines Gemisches von TFA-Dipeptid-methylestern. LKB 9000. SF96, Kapillare, 150°, 20 Min. isotherm, dann 10°/Min. bis 200°. Separator: 270°, Ionenquelle: 290°, Trägergas: 25 ml He/Min.

L = Lösungsmittel

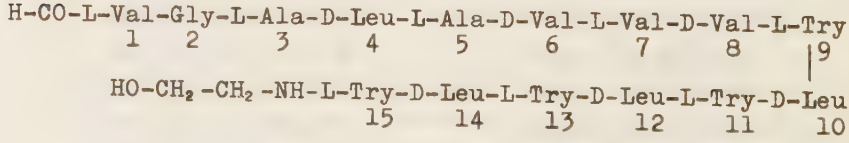
1 = TFA-Ala-Ala-OMe
2 = TFA-Ala-Gly-OMe
3 = TFA-Gly-Ala-OMe
4 = TFA-Ala-Val-OMe
5 = TFA-Gly-Val-OMe
6 = TFA-Leu-Ala-OMe
7 = TFA-Ala-Leu-OMe
8 = TFA-Gly-Leu-OMe
9 = TFA-Leu-Gly-OMe
10 = TFA-Gly-Asp-$(OMe)_2$
11 = TFA-Ala-Met-OMe
12 = TFA-Ala-Phe-OMe

Besonders wichtig war die Frage, ob auch S-Benzyl-Cystein-Peptidester einer gaschromatographischen Trennung zugänglich sind. Das Chromatogramm zeigt, (s. Abb. 11), daß dies wenigstens bis zu Tripeptid-Derivaten möglich ist. Da man bei diesen Trennungen jedoch bei Temperaturen bis über 250° C arbeiten muß, ist eine teilweise Zersetzung nicht auszuschließen. Beschränkungen sind dieser Hochtemperatur-Gas-Chromatographie vor allem auch durch die geringe Stabilität der flüssigen Phasen, mit denen das Säulenmaterial imprägniert ist, auferlegt. Dieses "Bleeding" wird bei hohen Temperaturen sehr stark und gibt natürlich einen Beitrag zum Massenspektrum, der die Spektren kleiner Peaks des Gas-Chromatogramms oft völlig überlagert.

III. Anwendungen

1. Gramicidin A

Die ersten Versuche einer Sequenzanalyse wurden mit Gramicidin A unternommen. Es handelt sich hierbei um ein Peptid, das aus 15 Aminosäurebausteinen besteht, und dessen Sequenz von R. Sarges und B. Witkop[27] aufgeklärt wurde. Die endständige Aminogruppe ist durch eine Formylgruppe substituiert, während das andere Ende des Moleküls mit einem Molekül Äthanolamin peptidartig verknüpft ist:



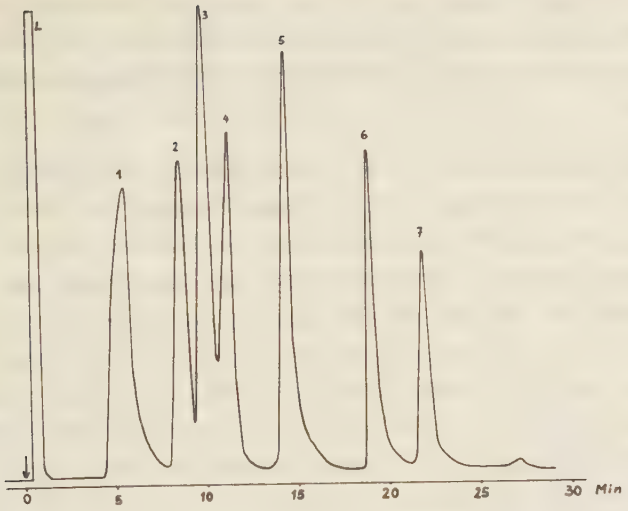


Abb. 11

Gas-Chromatogramm eines Gemisches von TFA-Peptid-estern.
LKB 9000. Säule: 5 % SE30, 5', 1/8", Stahl, 170°, 6 Min. isotherm, dann 6°/Min. bis 235°. Detektor: Totalionenstrom, Ionenquelle: 290°, Separator: 280°, Einspritzblock: 320°, Trägergas: 50 ml He/Min.

L = Lösungsmittel
1 = TFA-Ala-Gly-Gly-OMe
2 = TFA-Cys(Bzl)-Ala-OEt
3 = TFA-Cys(Bzl)-Gly-OEt
4 = TFA-Cys(Bzl)-Val-OEt
5 = TFA-Gly-Phe-Ala-OMe
6 = TFA-Ala-Cys(Bzl)-Ala-OMe
7 = TFA-Cys(Bzl)-Pro-Val-OMe

Durch das mehrmalige Auftreten des Teilstückes Try-Leu ist eine Sequenzbestimmung sehr erschwert. Am Beispiel des Gramicidins sollte jedoch nur Erfahrung gesammelt werden.

Die Partialhydrolyse, die normalerweise mit konz. HCl bei 37° C durchgeführt wird, konnte wegen des Gehalts an säurelabilem Tryptophan nicht in saurem Medium ausgeführt werden. Eine enzymatische Spaltung kam auch nicht in Frage, da das Peptid infolge seiner Endgruppen in Wasser unlöslich ist. Es blieb also nur noch die Möglichkeit einer alkalischen Spaltung. Diese wurde in 1 n methanolischer Natronlauge im Vakuumrohr durchgeführt. Danach wurde das Hydrolysat mit Eisessig angesäuert, eingedampft und der Rückstand mehrmals mit Methanol ausgeschüttelt. Nach dem Einengen wurde mit einem Überschuß an Diazomethan verestert und schließlich mit Trifluoressigsäuremethylester trifluoracetyliert.

Das TFA-Peptidester-Gemisch wurde zunächst an einer Kapillarsäule untersucht. Das Chromatogramm ist in Abb. 12 dargestellt. Die Auswertung ergab die Bruchstücke Val-Gly, Ala-Val, Leu-Ala, Ala-Leu, Val-Val. Besonders bemerkenswert war das Auftreten von identischen Massenspektren bei Peak 3 und 4, Peak 6 und 7 und Peak 8 und 9 (s. Abb. 12). Offenbar handelt es sich hierbei um diastereoisomere Dipeptid-Derivate (Ala-Val, Leu-Ala, Ala-Leu). Die gaschromatographische Trennung von diastereoisomeren TFA-Dipeptidmethylestern wurde schon von F. Weygand[2,28] beschrieben. Er beobachtete, daß die optisch einheitlichen Dipeptid-Derivate kürzere Retentionszeiten als die optisch gemischten Formen haben. Da aus der ursprünglichen Sequenz nur

für das Dipeptid Val-Val ein Diastereomerenpaar zu erwarten wäre, müssen die anderen Diastereomeren durch Racemisierung bei der Hydrolyse entstanden sein. Von Racemisierungen, die besonders bei alkalischer Hydrolyse auftreten, ist auch von anderen Autoren berichtet worden[29].

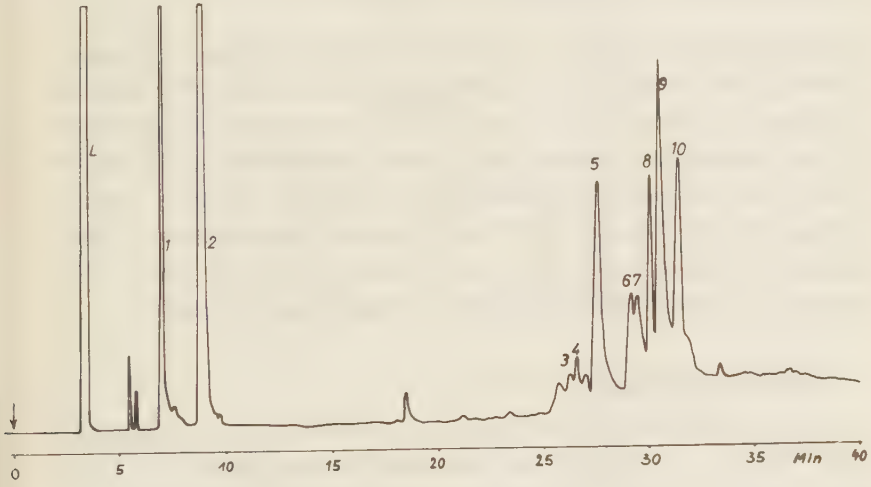


Abb. 12

Gas-Chromatogramm von TFA-Peptidestern des Gramicidin-A-Hydrolysates. LKB 9000. Säule: SF96, Kapillare, 125°, 3°/Min. bis 190°. Einspritzblock: 280°, Separator: 270°, Ionenquelle: 290°.

L = Lösungsmittel
1 = TFA-Val-OMe
2 = TFA-Leu-OMe
3 = TFA-Ala-Val-OMe
4 = TFA-Ala-Val-OMe
5 = TFA-Val-Gly-OMe
6 = TFA-Leu-Ala-OMe
7 = TFA-Leu-Ala-OMe
8 = TFA-Ala-Leu-OMe
9 = TFA-Ala-Leu-OMe
10 = TFA-Val-Val-OMe

Die Untersuchungen des Peptid-Hydrolysates an einer kurzen, gepackten Säule zeigt die Abb. 13. Neben den schon an der Kapillarsäule identifizierten Dipeptid-Derivaten, deren schlechte Trennung hier keine Rolle spielt, wurden noch die TFA-Derivate von Val-Val-Val, Ala-Leu-Ala, Try-Leu und Leu-Try identifiziert. In der Tabelle 10 sind noch einmal das Gesamtpeptid und die gefundenen Bruchstücke angegeben.

Zusammenfassend kann über diese Untersuchungen gesagt werden, daß die Gas-Chromatographie zur Analyse von Sequenzen, in denen sich, wie beim Gramicidin A, Sequenzteile mehrmals wiederholen, nicht ausreicht. In diesem Fall sind Tetra- und Pentapeptide nötig, um den Tryptophan enthaltenden Teil der Sequenz festzulegen. Zur Trennung dieser Peptide, die schwer flüchtig sind, müssen andere Trennmethoden herangezogen werden.

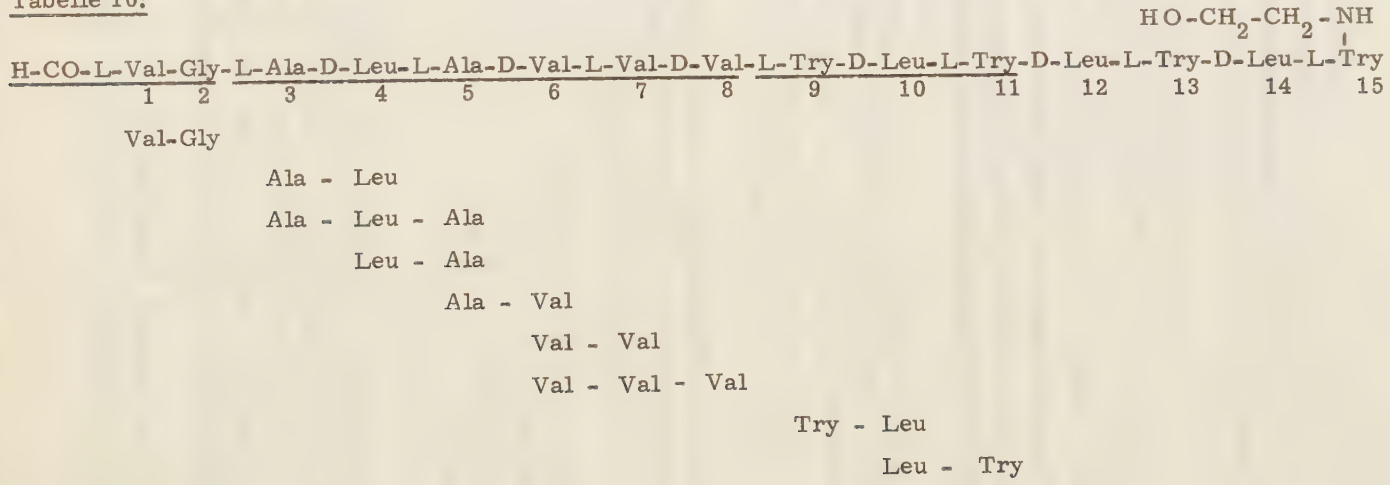
2. S-Benzyl-Ser^4-Oxytocin

Die Synthese dieses Nonapeptids wurde von H. Hagenmaier[30] nach der Merrifield-Methode durchgeführt. Da es bis heute keine zuverlässige Methode gibt, die Ausbeute bei jeder einzelnen Synthesestufe zu verfolgen, war vor allem die Frage zu klären, ob z.B. bei der Herstellung des Tetrapeptids im Falle der nicht quantitativ umgesetzten Dipeptidstufe ein Tripeptid entsteht, das nicht in die Sequenz paßt.

So wurden von der Dipeptidstufe an jeweils 80 bis 100 mg Harz mit dem daranhängenden Peptid untersucht. Bei einer Beladung von 1,8 m Mol Peptid pro Gramm Harz wurden also jeweils etwa 0,18 m Mol Peptid für die Untersuchungen verwendet. Die Gesamtsequenz des Nonapeptides ist die folgende:

Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly

Tabelle 10:


HO-CH2-CH2-NH
H-CO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Try-D-Leu-L-Try-D-Leu-L-Try-D-Leu-L-Try
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Val-Gly
Ala - Leu
Ala - Leu - Ala
Leu - Ala
Ala - Val
Val - Val
Val - Val - Val
Try - Leu
Leu - Try

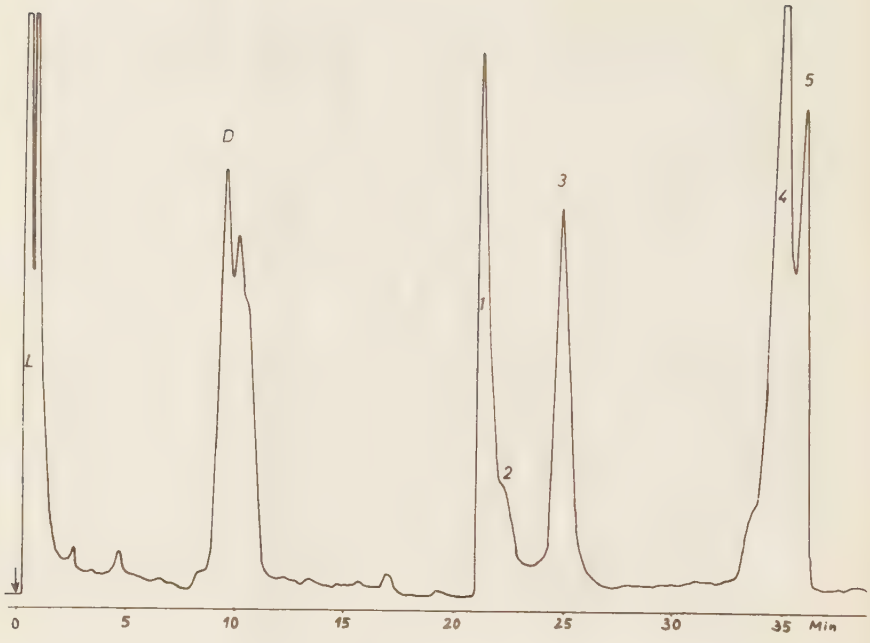


Abb. 13

Gas-Chromatogramm von TFA-Peptidestern des Gramicidin-A-Hydrolysates.
LKB 9000. Säule: 5 % OV1 auf Chromosorb P, Stahl, 1,5 m, 1/8" Ø, 120°, 4°/Min. bis 235°, Separator: 270°, Einspritzblock: 280°, Ionenquelle: 290°.

L = Lösungsmittel
D = TFA-Dipeptidmethylester

1 = TFA-Try-OMe
2 = TFA-Ala-Leu-Ala-OMe
3 = TFA-Val-Val-Val-OMe
4 = TFA-Try-Leu-OMe
5 = TFA-Leu-Try-OMe

Verschiedene Aminosäuren wurden in Form ihrer Benzylderivate in die Sequenz eingeführt (Cys, Tyr, Ser).

Bis zur Pentapeptidstufe konnte die Synthese direkt verfolgt werden. Nach der Abspaltung vom Harz nach Merrifield[31] mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure, der Veresterung und Trifluoracetylierung wurden die Massenspektren der folgenden Peptidderivate aufgenommen:

Leu-Gly
Pro-Leu-Gly
Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly
Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly

Das TFA-Derivat von Ser(Ac)-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly war für die Aufnahme eines Massenspektrums infolge seiner zu geringen Flüchtigkeit nicht mehr geeignet.

Bis zum Pentapeptid waren außer den gewünschten Produkten bei den einzelnen Stufen keinerlei andere Peptidbruchstücke feststellbar. Es kann also angenommen werden, daß die Umsetzungen von Stufe zu Stufe vollständig verliefen.

Eine endgültige Aussage über die Beschaffenheit des Endproduktes sollte eine Analyse des Hydrolysates bringen. Als Endprodukt war nach dem letzten Syntheseschritt das folgende Nonapeptidderivat zu erwarten:

BOC-Cys(Bzl)-Tyr(Bzl)-Ile-Ser(Bzl)-Asn-Cys(Bzl)
Polymeres-CH_2-O-Gly-Leu-Pro

Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach einem neuen Verfahren[32] in mit Ammoniak gesättigtem Methanol durch 2-tägiges Stehenlassen bei Raumtemperatur.

Dabei erhält man das Peptid in Form des Säureamides in sehr guten Ausbeuten.

Zur Abspaltung der BOC-Gruppe und der Benzylgruppen von Serin und Tyrosin wurde das Produkt 1/2 Std. mit Bromwasserstoff-Trifluoressigsäure behandelt.

Die Hydrolyse des nun vorliegenden S-Benzyl-Nonapeptidamids erfolgte in 10 n Salzsäure durch dreitägiges Stehenlassen bei 37° C. Das Reaktionsgefäß wurde dabei abgedunkelt, da sich das Reaktionsgemisch bei einer früheren Hydrolyse beim Stehenlassen am Licht gelbbraun verfärbt hatte. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Salzsäure im Vakuum abgedampft und das Hydrolysat in Methanol aufgenommen. Ein Fünftel der Lösung diente zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchung, während der Rest für eine säulenchromatographische Trennung aufbewahrt wurde.

a) Gaschromatographische Untersuchungen

Nach dem Verestern und Trifluoracetylieren wurde das Peptidgemisch an einer gepackten Säule am kombinierten Gas-Chromatograph-Massenspektrometer chromatographiert. Das Trennchromatogramm ist in Abb. 14 dargestellt. Die Tab. 11 zeigt die gefundenen Bruchstücke und die Gesamtsequenz:

Tabelle 11:

Cys(Bzl)-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly
Tyr-Ile
Ile-Ser
Ser-Asp
Cys(Bzl)-Pro
Cys(Bzl)-Pro-Leu
Pro-Leu
Pro-Leu-Gly
Leu-Gly

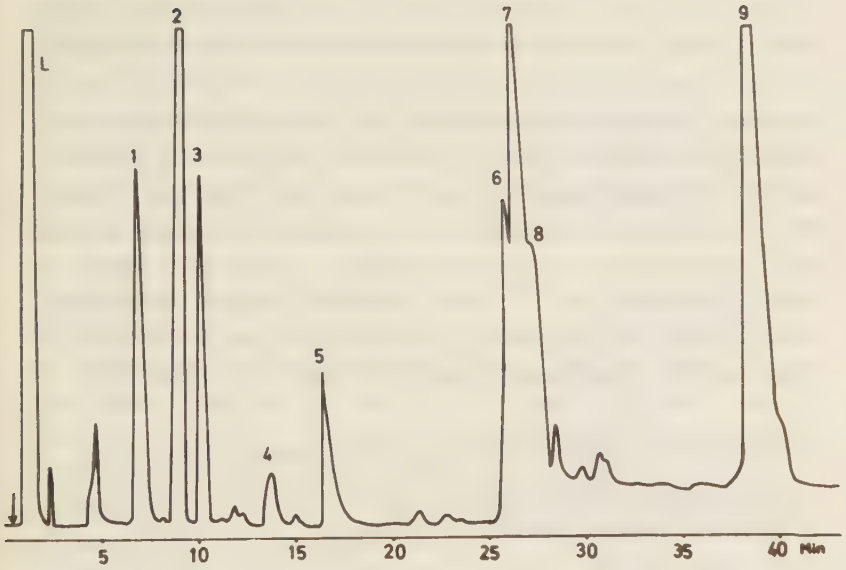


Abb. 14

Gas-Chromatogramm von TFA-Peptidestern des Hydrolysats von Cys(Bzl)-Ser^4-Oxytocin.
LKB 9000. Säule: 5 % SE30 auf Chromosorb P, 5', 1/8", Stahl, 130°, 3°/Min. bis 250°, Detektor: Totalionenstrom, Ionenquelle: 290°, Separator: 285°, Einspritzblock: 300°.

L = Lösungsmittel
1 = TFA-Leu-Gly-OMe
2 = TFA-Cys(Bzl)-OMe
3 = TFA-Pro-Leu-OMe
4 = TFA-Ile-Ser-OMe
5 = TFA-Ser-Asp-$(OMe)_2$
6 = TFA-Pro-Leu-Gly-OMe
7 = TFA-Cys(Bzl)-Pro-OMe
8 = TFA-Tyr-Ile-OMe
9 = TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-OMe

Große Teile der Sequenz sind also allein durch gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen geklärt. Zu bemerken wäre noch, daß das in der Sequenz enthaltene Asparagin bei der Säurehydrolyse erwartungsgemäß in Asparaginsäure übergeht[33]. Besonders wichtig war das Auftreten des Peptids Ile-Ser, da bei der sauren Hydrolyse die Peptidbindung, welche die Aminogruppe von Serin enthält, besonders anfällig gegen Spaltung ist[29]. Bei einer zu langen Hydrolyse kann diese Peptidbindung quantitativ gespalten werden und die Sequenzanalyse wird dadurch unmöglich.

b) Verteilungs-Chromatographie an Sephadex G 15

Die verschiedenen Methoden der Flüssigkeits-Chromatographie haben sich bei der Trennung von Peptiden sehr bewährt und spielen bei den meisten Sequenzanalysen, die in der Literatur beschrieben sind, eine wichtige Rolle. Meistens führte die Elektrophorese und vor allem die Ionenaustauscher-Chromatographie bei der Trennung der Peptidhydrolysate zum Erfolg. Bei der Anwendung von S-Benzyl-Derivaten haben diese Methoden den Nachteil, daß sie an wässrige Medien gebunden sind, in denen sich diese Derivate nur sehr schwer lösen. Es wurde daher zur Trennung des oben beschriebenen Hydrolysates die von D. Yamashiro[34] beschriebene und bisher weniger bekannte Methode der Sephadex-Verteilungs-Chromatographie benutzt. Bei diesem Verfahren wird, ähnlich wie bei der Gegenstromverteilung, die unterschiedliche Löslichkeit verschiedener Substanzen in den beiden Phasen eines Lösungsmittelsystems zur Trennung benötigt.

Das Lösungsmittelgemisch bestand aus Butanol, Propanol, Eisessig und Wasser und schied sich in eine wässrige und eine organische Phase. Die Säule (120 x 1,5 cm)

wurde nacheinander mit bidestilliertem Wasser, 0,1 n Essigsäure, wässriger und organischer Phase equilibriert. Anschließend wurde das in wenigen ml organischer Phase gelöste Peptidhydrolysat vorsichtig auf die Säule aufgetragen und mit organischer Phase eluiert. Die Trennung wurde mittels einer Durchflußküvette photometrisch verfolgt und das Eluat in Fraktionen von 5,3 ml von einem Fraktionssammler automatisch gesammelt.

Abb. 15 zeigt das Trennchromatogramm. Anhand dieses Chromatogramms wurden die gesammelten Fraktionen in 10 Hauptfraktionen zusammengefaßt (HF, s. Abb. 15). Jede einzelne der 10 Fraktionen wurde getrennt aufgearbeitet, d.h., der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels verbliebene Rückstand wurde verestert, trifluoracetyliert und im Direkt-Einlaßsystem des Massenspektrometers untersucht.

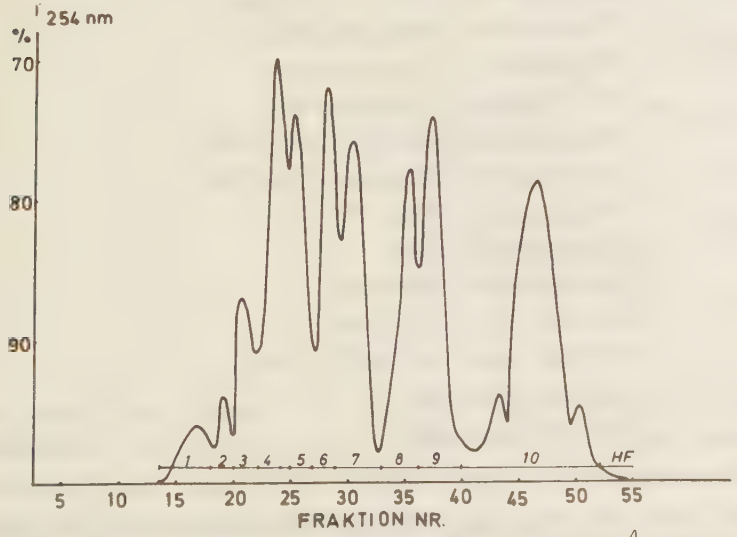


Abb. 15: Trennchromatogramm des Cys(Bzl)-Ser^4-Oxytocin-Hydrolysates. Fraktionseinteilung. Sephadex G 15 Verteilungs-Chromatographie. Säule: 120 x 1,5 cm. Lösungsmittelgemisch: Butanol, Propanol, Essigsäure, Wasser.

Bei diesen Untersuchungen wurden die in Tabelle 12 angegebenen Peptidderivate identifiziert. Obwohl in den einzelnen Hauptfraktionen oft mehrere Peptidderivate vorlagen, konnten sie durch langsames Aufheizen des Probenhalters durch fraktionierte Verdampfung in die Ionenquelle in ihren Massenspektren weitgehend voneinander getrennt werden.

Tabelle 12:

HF 1	TFA-Cys(Bzl)-Tyr(Bzl)-Ile-OMe
	TFA-Asp-Cys(Bzl)-Pro-Leu-$(OMe)_2$
HF 2	TFA-Asp-Cys(Bzl)-Pro- Leu-$(OMe)_2$
HF 3	TFA-Cys(Bzl)-Tyr-Ile-OMe
HF 4	TFA-Cys(Bzl)-Tyr-Ile-OMe
HF 5	TFA-Cys(Bzl)-Tyr-Ile-OMe
	TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-OMe
HF 6	TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-OMe
	TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-OMe
HF 7	TFA-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-OMe
HF 8	TFA-Cys(Bzl)-Tyr-OMe
	TFA-Cys(Bzl)-OMe
HF 9	TFA-Cys(Bzl)-Tyr-OMe
	TFA-Cys(Bzl)-Pro-OMe
HF 10	TFA-Ser-Asp-Cys(Bzl)-$(OMe)_2$
	TFA-Tyr-Ile-OMe
	TFA-Pro-Leu-OMe

Das in HF 1 gefundene O-Benzyl-Tyrosin-Derivat zeigt, daß die Abspaltung der O-Benzyl-Gruppe in HBr/Trifluoressigsäure nicht vollständig war. Ein Teil der

Fraktion 10 wurde acetyliert. Im Massenspektrum konnten die typischen Fragmente, die für ein O-Acetyl-Serin-Derivat zu erwarten waren, beobachtet werden.

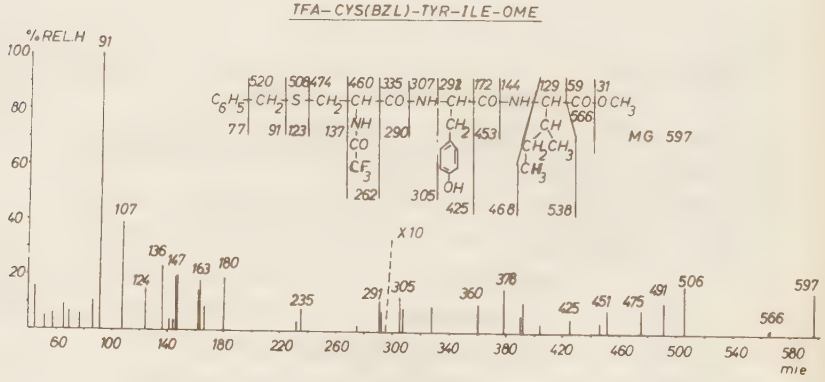
Mit den bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse gefundenen Sequenzteilen ergibt sich die Gesamtsequenz des Nonapeptids (Tab. 13).

Tabelle 13:

Cys(Bzl)-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly
Cys(Bzl)-Tyr-Ile
Cys(Bzl)-Tyr
Tyr-Ile
Ile-Ser
Ser-Asp
Ser-Asp-Cys(Bzl)
Asp-Cys(Bzl)-Pro-Leu
Cys(Bzl)-Pro
Cys(Bzl)-Pro-Leu
Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly
Pro-Leu
Pro-Leu-Gly
Leu-Gly

Da außer den angegebenen Peptidderivaten keine weiteren nicht zur Sequenz gehörigen Peptidfragmente gefunden wurden, kann angenommen werden, daß die Synthese des Nonapeptids in der gewünschten Weise verlief und die Umsetzungen nahezu quantitativ erfolgten.

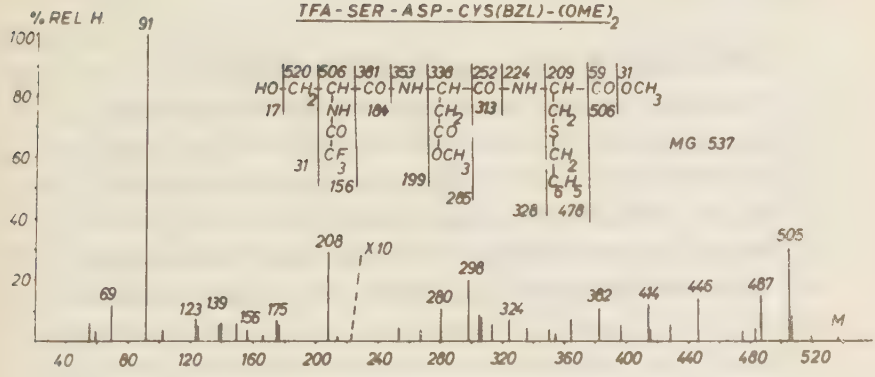
In den Abbn. 16 und 17 sind die Massenspektren von TFA-Cys(Bzl)-Tyr-Ile-OMe bzw. TFA-Ser-Asp-Cys(Bzl)$(OMe)_2$ dargestellt. Diese beiden Sequenzen hätten, neben den gaschromatographisch-massenspektrometrisch identifizierten Bruchstücken, zur Ableitung der Sequenz des Nonapeptids genügt.



m/e		
	597	M
	566	$M-OCH_3$
	506	$M-C_7H_7$
	491	$M-C_7H_6O$ (Tyr)
	475	$M-C_6H_5-CH=S$
	378	$M-(CF_3-CO-NH_2+C_7H_6O)$
	291	$HO-C_6H_4-CH=CH-CO-NH-CH(CH(CH_3)-CH_2-CH_3)-COOCH_3$

Abb. 16

Massenspektrum von TFA-Cys(Bzl)-Tyr-Ile-OMe. Fragmentierungsschema und Interpretation einiger wichtiger Ionen. LKB 9000. Direkteinlaßsystem, 50 eV, Ionenquelle: 250°, Probenhalter: 170°.



m/e	537	M
	519	$M-H_2O$
	505	$M-CH_3OH$
	487	$M-(CH_3OH+H_2O)$
	446	$M-C_7H_7$
	414	$M-C_6H_5-CH_2-S$
	382	$M-(CH_3OH+C_6H_5-CH_2-S)$
	298	328-CH_3OH (s. Schema)
	280	313-(CH_3OH+H) (s. Schema)
	208	$C_6H_5-CH_2-S-CH=CH-COOCH_3$

Abb. 17

Massenspektrum von TFA-Ser-Asp-Cys(Bzl)-$(OMe)_2$. Fragmentierungsschema und Interpretation einiger wichtiger Ionen.
LKB 9000. Direkteinlaßsystem, 50 eV, Ionenquelle: 250°, Probenhalter: 130°.

C Experimenteller Teil

I. Gas-Chromatographie - Massenspektrometrie

Für die gaschromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen wurde das Kombinationsgerät LKB 9000 benützt. Sämtliche Massenspektren wurden bei einer Elektronenenergie von 50 eV aufgenommen. Das Kathodenmaterial war ein Rheniumband. Für die Feststoffanalysen diente ein Direkteinlaßsystem mit direkter Heizung und gleichzeitiger Wasserkühlung. Die Proben wurden aus einem Glasröhrchen direkt in die Ionenquelle verdampft.

Die Bedingungen der Gas-Chromatographie sind den einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

II. Sephadex-Verteilungs-Chromatographie

1. Vorbehandlung des Trägermaterials

Das käufliche Trägermaterial Sephadex G 15 (Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) hat eine Korngröße von 40 - 120 µ. Da eine so unterschiedliche Korngröße erfahrungsgemäß die Durchflußeigenschaften und damit die Trennwirksamkeit einer Säule ungünstig beeinflußt, wurden Teilchen der Korngröße kleiner als 50 µ und größer als 75 µ durch Aussieben abgetrennt. Zur Entfernung von Schwermetallionen wurde das Material mit bidestilliertem H_2O, 0,5 n NaOH, bidest. H_2O bis zu einem PH 7 - 8, 0,5 n HCl, bidest. H_2O bis zu einem PH 6 - 7 gewaschen und mit 0,1 n Essigsäure equilibriert.

2. Säule

Die Glasrohrsäule (120 x 1,5 cm) war am unteren Ende mit einer Glasfritte G2 und einem Teflonhahn mit feinregulierbarem Nadelventil, am oberen Ende mit einem Schliff NS 14,5 versehen. Das 1 Liter fassende Vorratsgefäß mit Teflonhahn war durch Schliffe und einen Teflonschlauch mit der Säule verbunden. Das in 0,1 n Essigsäure equilibrierte Trägermaterial wurde in einem Guß in die Säule eingefüllt.

3. Chromatographie

Die Säule wurde zunächst mit 250 ml der wässrigen Phase des Lösungsmittelgemisches Butanol-Propanol-Essigsäure-Wasser (Volumenverhältnis 600 : 300 : 10,25 : 890) equilibriert. Darauf wurde die wässrige Phase über der Säulenfüllung entfernt und solange mit organischer Phase equilibriert, bis die wässrige Phase aus der Säule verdrängt war und die organische Phase im Eluat erschien. Nun wurde das in möglichst wenig (3 - 5 ml) organischer Phase gelöste Peptidgemisch auf die Säule gegeben und mit organischer Phase chromatographiert.

Die Extinktion des Eluats wurde von einem Uvicord (LKB) bei 254 nm gemessen und von einem Schreiber aufgezeichnet. Die 5,3 ml-Fraktionen wurden von einem Fraktionssammler (LKB) automatisch gesammelt.

4. UV-Spektroskopie

Zur Kontrolle wurden die einzelnen Fraktionen der obigen Trennung noch mit einem Zeiss-PMQ II-Spektralphotometer bei den Wellenlängen 230, 260 und 274 nm durchgemessen. Die Meßwerte stimmten mit dem Spektrogramm (Abb. 15) gut überein.

III. Herstellung der Peptid-Derivate

1. Benzylierung

10 mg Peptid werden in einem 50 ml-Kölbchen in 10 ml flüssigem NH_3 gelöst (Magnetrührer). Darauf wird vorsichtig in flüssigem NH_3 gelöstes Na zugetropft, bis die blaue Farbe 2 Minuten konstant bleibt und die doppelte, dem Peptid entsprechende, molare Menge Benzylchlorid zugegeben (ca. 3 Tropfen!). Das NH_3 wird langsam unter Rühren verdampft und das Reaktionsgefäß bei 18 Torr kurz evakuiert. Das möglicherweise vorhandene überschüssige Benzylchlorid wird zweimal mit Äther extrahiert und der Rückstand in Methanol aufgenommen und mit Eisessig auf einen PH von 6 - 6,5 gebracht.

Nach demselben Verfahren wurden die p-Cl-Benzylierungen vorgenommen.

2. Veresterung

a) HCl/Methanol

10 mg Peptid werden in 5 ml trockenem Methanol aufgeschlämmt und auf ca. 0° C abgekühlt. Durch Einleiten von etwas trockenem HCl-Gas wird das Peptid in Lösung gebracht. Das Einleiten von HCl wird unterbrochen und die Lösung auf -30° C abgekühlt. Darauf wird bis zur Sättigung HCl eingeleitet. Nach 3-stündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wird das HCl/Methanol im Vakuum bei 20° C abgezogen. Der Rückstand, Peptidmethylester-Hydrochlorid, kann sofort zum TFA-Derivat weiterverarbeitet werden.

b) Thionylchlorid[12]

10 mg Peptid in 5 ml absolutem Methanol werden bei -50° C mit 1 ml frischem Thionylchlorid tropfenweise versetzt. Nach 15-stündigem Stehen bei Raumtemperatur wird das Methanol und das überschüssige Thionylchlorid im Vakuum bei 20° C abgezogen. Als Rückstand bleibt Peptidmethylester-Hydrochlorid.

c) Diazomethan

α) Herstellung

Das in der üblichen Weise aus Nitrosomethylharnstoff und KOH in ätherischer Lösung erhaltene Diazomethan[35] wird im Vakuum bei 18 Torr in eine etwas Äther enthaltende auf -70° C gekühlte Kühlfalle destilliert. Dabei werden die meisten Verunreinigungen, die in der ursprünglichen Ätherlösung vorhanden sind, wie Wasser, Harnstoff und Nitrosomethylharnstoff, abgetrennt. Die so gereinigte Diazomethanlösung ist, bei -40° C aufbewahrt, wochenlang haltbar.

β) Veresterung

10 mg Peptid werden in 5 ml Methanol durch Zugabe von einigen Tropfen H_2O in Lösung gebracht. Die Zugabe von Diazomethanlösung erfolgt tropfenweise, bis die Lösung gelb bleibt. Das überschüssige Diazomethan wird durch Zugabe von 1 - 2 Tropfen Eisessig zerstört. Äther und Methanol werden bei 20° C im Vakuum (18 Torr) weitgehend abgezogen. Dann wird das restliche Methanol und Wasser im Hochvakuum (10^{-2} Torr) entfernt.

3. Trifluoracetylierung[15,23)]

Die nach einem der oben beschriebenen Verfahren gewonnenen Peptidester werden in 5 ml absolutem Methanol gelöst, durch Zugabe von wenigen Tropfen Triäthylamin auf einen PH-Wert von ca. 8 gebracht und mit ca. 2 ml Trifluoressigsäuremethylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 6 - 8 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird im Vakuum (18 Torr) bei 20° C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird zwischen Wasser und Essigester verteilt. Die Essigesterphase wird im Vakuum (18 Torr) eingedampft. Als Rückstand bleibt ein kristallines oder öliges Produkt, das ohne weitere Reinigung massenspektrometrisch untersucht wird.

4. O-Acetylierung von Serin-Peptiden

Einige mg des Peptids werden unter Kühlen in 1 - 2 ml mit Bromwasserstoff gesättigten Eisessig gegeben und unter Rühren eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird bei 20° C im Vakuum (18 Torr) eingedampft, mit 5 ml absolutem Methanol versetzt und nochmals eingedampft.

5. Abspaltung von Peptid-Ketten vom Harz

a) HBr-Trifluoressigsäure

Das Peptid-Harz wird in ca. 20 ml Trifluoressigsäure suspendiert. Aus einer Bombe wird nun HBr eingeleitet, das zuvor durch folgende Waschflaschen geleitet wird:

1. Sicherheitswaschflasche
2. Konz. H_2SO_4
3. Gesättigte Resorcin-Lösung in Eisessig
4. Kühlfalle (-50° C)

Nach 90 Minuten wird das Harz abfiltriert und mit Trifluoressigsäure ausgewaschen. Das Filtrat wird bei 20° C im Vakuum (18 Torr) eingedampft.

b) Methanol/NH_3 [32]

Das Peptid-Harz wird in 20 ml Methanol suspendiert. Danach wird auf -50° C abgekühlt und bis zur Sättigung NH_3 eingeleitet, das zuvor durch ein mit KOH gefülltes Trockenrohr geleitet wurde. Das Reaktionsgefäß wird darauf in einem Druckgefäß luftdicht abgeschlossen und 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach dem Abfiltrieren vom Harz wird die Lösung eingedampft und der Rückstand in Dimethylformamid gelöst. Mit Äther wird dann das Peptid, das bei dieser Abspaltungsmethode als Säureamid anfällt, aus Dimethylformamid ausgefällt, abfiltriert und getrocknet.

6. Partial-Hydrolyse von Peptiden

a) Saure Hydrolyse [7,8]

100 mg Peptid werden in 5 ml konz. HCl gelöst und in einem thermostatisierten Reaktionsgefäß 72 Stunden bei 37° C gerührt. Es empfiehlt sich dabei, das Reaktionsgefäß abzudunkeln. Danach wird die überschüssige Salzsäure bei 20° C im Vakuum abgedampft. Die zurückbleibenden Peptid-Hydrochloride können weiterverarbeitet werden.

b) Alkalische Hydrolyse von Gramicidin A

100 mg Peptid werden in einem stabilen Glasrohr mit 3 ml 1 n methanolischer Natronlauge versetzt und im Hochvakuum (10^{-2} Torr) eingeschmolzen. Das Glasrohr wird dann 24 Stunden auf 100° C erhitzt. Danach wird die Lösung mit konz. Essigsäure auf einen PH-Wert von 6 gebracht und eingedampft. Der Rückstand wird mehrmals mit Methanol ausgeschüttelt. Auf diese Weise werden die Peptide vom Natrium-Acetat weitgehend abgetrennt.

D Zusammenfassung

Durch Verestern der freien Carboxylgruppe mit Diazomethan und durch Trifluoracetylieren der freien Aminogruppe mit Trifluoressigsäuremethylester werden Peptide in flüchtige Derivate überführt, die für eine massenspektrometrische Sequenzanalyse geeignet sind. Die instabilen Cystein-Peptide wurden erstmals in Form von S-Benzyl-Derivaten massenspektrometrisch untersucht und die auftretenden Fragmentierungen eingehend diskutiert. Aus den Bruchstücken ist eine Feststellung von N- und C-terminalem Cystein sowie der Position von Cystein in der Peptidkette leicht möglich. Durch direkte Verdampfung in die Ionenquelle können die Massenspektren von S-Benzyl-Cystein-Derivaten mindestens bis zu Pentapeptiden aufgenommen werden. Gaschromatographisch wurden S-Benzyl-Cystein enthaltende Di- und Tripeptidderivate getrennt. Die ebenfalls wenig stabilen Serin-Peptide wurden O-acetyliert. Die Massenspektren von Di-, Tri- und Tetrapeptidderivaten mit O-Acetyl-Serin wurden genau untersucht. Auch hier ist eine Sequenzableitung ohne weiteres möglich.

Erstmals wurden auch TFA-Peptidester mit Asparagin und Glutamin massenspektrometrisch untersucht. Diese Verbindungen lassen sich mindestens bis zu Pentapeptiden unzersetzt verdampfen.

Am Beispiel eines Nonapeptides mit Cystein konnte gezeigt werden, daß die Ableitung der Aminosäuresequenz durch Anwendung der Gas-Chromatographie, der Sephadex-Verteilungs-Chromatographie und der Massenspektrometrie möglich ist.

E Literaturverzeichnis

1) E. Stenhagen, Z. analyt. Chem. 181, 462 (1961)
2) F. Weygand, B. Kolb, A. Prox, M. A. Tilak und J. Tomida, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 38 (1960)
3) F. Weygand, B. Kolb und P. Kirchner, Z. analyt. Chem. 181, 396 (1961)
4) F. Weygand, Z. analyt. Chem. 205, 406 (1964)
5) F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel und K. Kun Sun, Z. Naturforschg. 20b, 1169 (1965)
6) A. Prox und F. Weygand, Proc. VIIIth Europ. Peptide Symposium, Nordwijk, Sept. 1966, S. 158
7) F. Sanger und H. Tuppy, Biochem. J. 49, 463 (1951)
8) F. Sanger und E. O. P. Thompson, Biochem. J. 53, 353 (1953)
9) W. A. Schroeder, R. T. Jones, J. R. Shelton, J. B. Shelton, J. Cormick und K. McCalla, Proc. Nat. Acad. Sci. US 47, 811 (1961)
10) M. Tanaka, T. Nakashima, A. Benson, H. F. Mower und K. T. Yasunobu, Biochemistry 5, 1666 (1966)
11) E. Fischer, Ber. 39, 530 (1906)
12) R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta 38, 1491 (1955)
13) F. Weygand und R. Geiger, Ber. 89, 647 (1956)
14) F. Weygand und R. Geiger, Ber. 92, 2099 (1959)
15) F. Weygand, A. Prox, E. C. Jorgensen, R. Axen und P. Kirchner, Z. Naturforsch. 18b, 93 (1963)
16) J. L. Wood und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. 130, 109 (1939)
17) F. Suter, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 20, 562 (1895) und 29, 350 (1903)
18) G. Jung, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1965)
19) G. Jung, Dissertation, Universität Tübingen (1967)
20) H. Hagenmaier, Tetrahedron (1968), im Druck.

21) E. Bayer, W. Parr und B. Kazmaier, Arch. Pharmaz. 298, 196 (1965)
22) E. Bayer und W. Parr, Angew. Chem. 78, 824 (1966)
23) E. Bayer, G. Jung und W. König, Z. Naturforsch. 22b, 924 (1967)
24) W. Simon, Z. analyt. Chem. 221, 368 (1966)
25) R. Ryhage, Arkiv Kemi 20, 185 (1962)
26) R. Ryhage, Analyt. Chem. 36, 759 (1964)
27) R. Sarges und B. Witkop, J. Amer. Chem. Soc. 86, 1861 (1964)
28) F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer und W. König, Angew. Chem. 75, 282 (1963)
29) R. L. Hill, Advan. Protein Chem. 20, 37 (1965)
30) H. Hagenmaier, Universität Tübingen (1967), unveröffentlicht.
31) R. B. Merrifield, Biochemistry 3, 1385 (1964)
32) H. Hagenmaier, Tetrahedron letters (1968), im Druck.
33) R. Schwyzer, Helv. chim. Acta 41, 1273 (1958)
34) D. Yamashiro, Nature 201, 76 (1964)
35) "Organikum", Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 4. Aufl., S. 505 (1964)
36) P. A. Cruickshank und J. C. Sheehan, Analyt. Chem. 36, 1191 (1964)
37) K. Heyns und H. F. Grützmacher, Fortschr. chem. Forsch. 6, 565 (1966)
38) H. F. Grützmacher und K. Heyns, Liebigs Ann. Chem. 698, 24 (1966)

L e b e n s l a u f

Am 28.10.1939 wurde ich als Sohn des Angestellten Alfred König und dessen Ehefrau Margarete König, geb. Meier, in Römerstadt, Sudetenland, geboren. Nach der Vertreibung aus meiner Heimat besuchte ich von 1946 bis 1950 zunächst die Volksschule in Stendal, später Volksschulen in verschiedenen Gemeinden des Kreises Göppingen. Im Herbst 1950 trat ich in das Hohenstaufen-Gymnasium in Göppingen ein, wo ich im Frühjahr 1959 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1959 begann ich das Studium der Chemie an der Universität Tübingen. Im vierten Semester bekam ich einen Arbeitsplatz im anorganischen Praktikum, im März 1963 legte ich die Diplom-Vorprüfung, im Juli 1965 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker ab.

Danach führte ich im Chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer die Diplomarbeit und anschließend von Juni 1966 bis Februar 1968 die Doktorarbeit durch.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren E. Bayer, W. Braunbek, K. Brodersen, W. Bues, W. v. Engelhardt, H. Hellmann, S. Haussühl, G. Kortüm, H. Krüger, F. Lingens, H. Mauser, Eu. Müller, G. Opitz und W. Rüdorff.